

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
Abteilung für Innere Medizin mit
Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Leiter: Prof. Dr. H. Brücher

Multiparameteranalyse immunologisch definierter
akuter lymphoblastischer Leukämie im Kindesalter

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Paweł Kofecki
aus Poznań, Polen

1983



Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
Abteilung für Innere Medizin mit
Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Leiter: Prof. Dr. H. Brücher

Multiparameteranalyse immunologisch definierter
akuter lymphoblastischer Leukämie im Kindesalter.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Paweł Kołdecki

aus Poznań, Polen

Referent: Professor Dr. H. Brücher

Korreferent: Professor Dr. D. Huhn

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 28. März 1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	4
A. Patienten	4
B. Methoden	6
1. Immunologische Untersuchungen	6
a. Material	6
b. Zellseparation	7
c. Rosettenteste	8
-E _N -Rosetten	8
-Complementrezeptoren der C ₃ b Komponente	9
d. Membrangebundenes Immunglobulin	10
e. Zytoplasmatisches Immunglobulin	10
f. Monoclonale Antikörper	12
g. Bestimmung der terminalen Desoxynucleotidyl Transferase	14
2. Morphologie	16
3. Zytochemie	17
4. Elektronische Zellvolumenbestimmung	17
5. Hämatologische Laborbefunde	20
6. Organbefall	20
7. Risikofaktor	20
8. Statistische Analyse	21
III. Ergebnisse	22
A. Immunologische Subklassifizierung der ALL	22
B. Multiparameteranalyse der immunologisch etablier- ten Subgruppen	33
IV. Diskussion	54
V. Zusammenfassung	67
VI. Literatur	69



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548817_0089

I. EINLEITUNG

In der Bundesrepublik Deutschland zeigen bösartige Erkrankungen im Kindesalter eine jährliche Inzidenz von etwa 2000 Neuerkrankungen. Statistischen Daten zufolge, beläuft sich hierbei der Anteil akuter Leukämien auf ca. dreißig Prozent. Achtzig Prozent entfallen hierbei auf die akuten lymphoblastischen Leukämien, womit diese Erkrankung die häufigste pädiatrische Neoplasie darstellt (1).

Die Einführung der ersten zytostatisch wirksamen Substanzen durch Farber (2) erweckte bereits die Hoffnung auf Kurabilität. Fortschritte im Verständnis des tumorbiologischen Verhaltens solcher Erkrankungen, wie auch neuere pharmakologische Kenntnisse ließen immer neuere und wirksamere Kombinations-Chemotherapie-Protokolle zur Anwendung kommen (3,4,5,6), die - insbesondere im Gefolge ihrer rapiden Entwicklung in den siebziger Jahren - sechzig bis achtzig prozentige Heilung an unselektioniertem Patientengut erwarten ließen (7).

Die sehr erfolgversprechenden Behandlungsergebnisse der letzten Jahre einerseits, andererseits aber auch die mit der gravierenden Behandlung verbundene und derzeit kaum vermeidbare Therapie-Morbidität und Mortalität waren Anlass zu Überlegungen, ob eine weitere Mobilisierung der diagnostischen Maßnahmen zum Ziele einer besser risikoadaptierten, prognoseorientierten und tumorbiologisch korrelierter Leukämieklassifikation führen könnten.

Etablierte Untersuchungstechniken zur Zelldefinition basieren auf dem morphologischen Erscheinungsbild und dem zyto- bzw. histochemischen Reaktionsmuster der Zelle. Die ultrastrukturelle Erfassung von Zellmerkmalen mittels Elektronenmikroskopie stellt eine - allerdings technisch sehr aufwendige - Erweiterung morphologischer Untersuchungsmethoden dar. Die Einführung immunologischer Techniken während der letzten Dekade, d.h. die Entdeckung sogenannter Immunmarker, hat das Spektrum der Zellcharakterisierungsmöglichkeiten

ergänzt und insbesondere die Leukämiediagnostik erweitert.

Ziel der immunologischen Typisierung von Leukämiezellen ist die Verbesserung der Leukämieklassifikation und die Zusammenfassung von unterschiedlichen klinischen Verlaufs- und Prognosegruppen zu einem einheitlichen Leukämietyp.

Diese sogenannten Immunmarker stellen zumeist membranintegrierte zelluläre Differenzierungsmerkmale (Membranmarker) dar. Es handelt sich hierbei entweder um Membranrezeptoren für bestimmte Substanzen oder Partikel oder antigene Zellmembrandeterminanten, die mit geeigneten Antisera identifiziert werden können. Bis vor ca. 2 Jahren waren absorbierte Heteroantisera die spezifische Antikörperquelle zur Erkennung von Oberflächenantigenen. Die Herstellung spezifischen Heteroantisera ist jedoch problematisch, einerseits da aufgrund der Unterschiedlichkeit der Immunantwort in den immunisierten Tieren die Produktion von Antikörpern mit identischer Spezifität schwierig ist, andererseits für optimale Spezifität Absorptionsschritte notwendig sind, die häufig zu niedrigtitrigen Antisera führen. Mit der Entwicklung der von Hybridomen abgeleiteten monoclonalen Antikörper von Köhler und Milstein (8) erscheinen diese Probleme überwunden und ein noch besserer Einblick in zelluläre Identität des hämatopoetischen Systems und die hieraus abzuleitende verbesserte Subklassifizierung akuter lymphoblastischer Leukämien (ALL) gewährleistet.

Bereits die grobe Diskriminierung der immunologischen ALL Subtypen, besonders die Erkennung der B-ALL mit all ihren biologischen Besonderheiten, führte zu einer entscheidenden Änderung der Therapieverfahren, und dadurch - um bei dem Beispiel der B-ALL zu bleiben - auch zu einer entscheidenden prognostischen Verbesserung dieser Gruppe (9, 10).

Frühere Versuche, die immunologischen Subtypen mit klinischen Merkmalen und prognostischen Daten zu korrelieren, (11, 12, 13, 14) stützen sich vornehmlich auf Untersuchungen mit heterologen Antisera und

versprechen daher durch die Anwendung monoclonaler Seren in ihrer diagnostischen Aussagefähigkeit erweiterungsfähig zu sein.

Ziel dieser Untersuchung war es, ein im Rahmen der ALL-Studie BFM 81/83 unter standardisierten Bedingungen therapiertes und morphologisch/zytochemisch zentral diagnostiziertes pädiatrisches Patientengut im Hinblick auf Ausprägung immunologischer Zellmarker mit monoclonalen und nicht-monoclonalen Techniken zu untersuchen und den Wert der immunologischen Klassifikation im Rahmen einer Multiparameteranalyse zu evaluieren. Diese schloß die Korrelation der Immunphänotypen zu Alters- und Geschlechtsverteilung, morphologischen und zytochemischen Merkmalen, zellvolumetrischen Ergebnissen, initialen hämatologischen Labordaten, Organmanifestationen und einem errechneten, die Tumormasse quantifizierenden Risikofaktor ein.

II. MATERIAL UND METHODEN

A. PATIENTEN

In Zeitraum von 1.7.1982 bis 31.10.1983 wurden im immunologischen Labor der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin (FUB) in Folge Leukämieblasten von 140 Kindern und Jugendlichen unterhalb des achtzehnten Lebensjahres immunologisch typisiert.

Bei allen Patienten wurden die morphologischen, zytochemischen, immunologischen und klinischen Untersuchungen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und vor jeder Therapie durchgeführt.

Das Material zur Immunmarkerphänotypisierung wurde dem Labor aus insgesamt 29 der an der ALL - Therapiestudie BFM 81/83 teilnehmenden Kliniken und Krankenanstalten überlassen. Je nach Zustell-
dauer wurde das Material innerhalb maximal 48 Stunden nach Entnahme verarbeitet.

Die Liste der teilnehmenden Kliniken und die Anzahl der von ihnen rekrutierten Studienpatienten, die einer immunologischen Blastentypisierung unterzogen wurden ist in der Tabelle 1. zusammengestellt.

Tab. 1.

Liste der teilnehmenden Kliniken und Anzahl der von ihnen rekrutierten Patienten.

Klinik	Patientenanzahl	Klinik	Patientenanzahl
Berlin	15	Köln ^{''}	9
Frankfurt	5	Erlangen	1
Münster	30	Stuttgart	5
Göttingen	1	Aalen	1
Heidelberg	5	Datteln	3
Nürnberg	2	Ludwigshafen	1
Tübingen	6	Worms	1
Homburg/Saar	4	Wuppertal	3
Köln [']	1	Würzburg	6
Hannover	3	Bonn	3
Gießen	9	Dortmund	2
Kiel	10	St. Augustin	3
Karlsruhe	2	Bremen	1
Essen	6	Trier	1
Augsburg	1		

['] Universitäts-Kinderklinik

^{''} Städtisches Krankenhaus

Das stets aus der gleichen Entnahme stammende Material wurde neben der morphologischen und zytochemischen Diagnostik in insgesamt 49 Fällen auch einer zellvolumetrischen Analyse unterzogen.

Die Daten anderer hämatologischer und klinischer Befunde (initiale hämatologische Laborwerte, Organmanifestationen) wurden den im Rahmen der BFM 81/83 von der Studienorganisation etablierten Meldebögen entnommen und in einer Datenverarbeitungsanlage eingespeichert.

Insgesamt wurden 136 der 140 evaluierten Patienten einheitlich nach dem BFM 81/83 Therapieprotokoll behandelt. In drei Fällen wurden

protokollwidrige Therapien durchgeführt. Ein Patient verstarb in der Initialphase der Behandlung.

In der Abbildung 1. ist die monatliche Patientenaufnahme in der immunologischen Studie im Vergleich zur Gesamtstudie dargestellt.

Abb. 1.

MONATLICHE PATIENTENAUFNAHME IN DER IMMUNOLOGISCHEN STUDIE IM VERGLEICH ZUR GESAMTSTUDIE



—— GESAMTSTUDIE n = 647

..... IMMUNOLOGISCHE STUDIE n = 140

B. METHODEN

1. Immunologische Untersuchungen

a. Material

Ca. 1 - 5 ml heparinisiertes Knochenmarkaspirat oder 10 - 20 ml

heparinisiertes Venenblut (stabilisatorfreies Heparin, Novo, Novo Industrie, Deutschland, 100 i.E./ml) wurden dem Labor zur Verfügung gestellt.

In aller Regel waren bei hochleukämischen Kindern keine Knochenmarkpunktionen durchgeführt worden. Hier wurde lediglich peripheres Blut untersucht.

Eingangskriterium für die vorliegende immunologische Studie war ein Blastengehalt von mehr als 70% in der jeweilig untersuchten Probe.

Die Typisierungen wurden an Frischmaterial durchgeführt. In einzelnen Fällen wurde für ergänzende Zusatzmarkeruntersuchungen kryopräserviertes Material verarbeitet. Die Einfrierung in flüssigem Stickstoff bei -169°C erfolgte mit dem "Microprocessor controlled freezing system MIC 15" Gerät (Cryoson, Deutschland) unter kontrolliert-programmierten Bedingungen in der Anwesenheit von 10% DMSO (Sigma, Deutschland) und 10% fötalem Kälberserum (FKS) (Gibco, USA). Das Auftauen erfolgte bei 37°C unter standardisierten Bedingungen mit 1% Bovinem Serum Albumin (BSA) (Behring, Deutschland) in der Anwesenheit von Deoxyribonuclease I (Worthington, USA) um ein Aneinanderkleben der Zellen zu vermeiden.

b. Zellseparation

Mononukleäre Knochenmarks- oder periphere Blutzellen wurden über konventionellen Ficoll - Hypaque Gradienten (Pharmacia, Schweden), Dichte 1,067 g/ml, nach der Methode von Böyum (15) isoliert. Für die Separation von Knochenmarksmononukleären wurden konische 10 ml Plastik - Röhrchen (Falcon, Frankreich), für die Separation von peripheren Blutmononukleären 50 ml Falcon Plastik - Röhrchen verwendet.

Das mit isotoner Kochsalzlösung 1:1 verdünnte Material wurde hierzu vorsichtig auf Ficoll - Hypaque geschichtet (2 ml für Knochenmark und 15 ml für peripheres Blut). Anschließend wurden die Proben

20 Minuten bei 800 x g zentrifugiert (Hettich Rotanta/S Zentrifuge, Hettich, Deutschland), ohne Bremse. Nach Abpipettieren der Interphase wurde die Zellsuspension im Falle einer Erythrozyten-Kontamination mit einem erythrozytenlysisierenden Ammoniumchlorid-Puffer[§] 10 Min. bei 4°C inkubiert und schließlich 5 Min. bei 600 x g abzentrifugiert und 2 mal in PBS-Dulbeco (Seromed, Deutschland) mit 0,2 % BSA für je 5 Min. bei 600 x g gewaschen.

§ Zusammensetzung des Puffers:

auf 1 Liter Aqua dest.

NH₄Cl 8,29 g

KHCO₃ 1,00 g

EDTA 0,372 g

Die Zellzahl wurde schließlich mit einem elektronischen Zählgerät (Coulter Counter, Coulter Electronics, USA) bestimmt und die Zellkonzentration auf $2,5 \times 10^6$ /ml viable Zellen (Trypan - Blau Farbstest) mit PBS-BSA eingestellt.

c. Rosettenteste

Es wurde die Rosettierbarkeit Neuraminidase-behandelter Blasten mit Hammelerythrozyten (Tierklinik, FUB) (EN-Rosetten) sowie die Expression der Complementrezeptoren der Complementkomponente C3b im Rosettentest erfasst.

- E_N-Rosetten

100 µl der auf $2,5 \times 10^6$ /ml eingestellten Zellsuspension wurden mit 50 µl FKS (zuvor mit Hammelerythrozyten absorbiert und 30 Min. bei 56°C inaktiviert) und 100 µl einer 1% Hammelerythrozytensuspension gemischt. Die Hammelerythrozyten waren zuvor 30 Min. bei 37°C mit Neuraminidase (Neuraminidase Vibrio cholerae, Behring, Deutschland) 0,1 Einheiten pro ml vorbehandelt, 2 mal mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen und auf eine 1%ige Lösung eingestellt worden. Nach 15 minütiger Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurden die Proben er-

neut zentrifugiert (10 Min., 200 x g) und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Als mit Hammelerythrozyten Rosetten-bildende Zellen wurden solche mit mehr als 3 an der Blastenmembran anhaftende Erythrozyten in der Neubauer - Kammer ausgezählt. Hierbei wurden stets zumindest 200 Zellen durchgemustert.

- Complementrezeptoren der C₃b - Komponente

Für die Darstellung von Complementrezeptoren der C₃b - Komponente an den Blasten wurden ebenfalls Hammelerythrozyten mit einem anti - Erythrozyten Antikörper der IgM Klasse vom Kaninchen gegen Hammel (Cordis, USA) in der maximal nicht agglutinierenden Dosis beladen (EA-IgM). Vor der Beladung waren die Hammelerythrozyten 3 mal mit NaCl gewaschen und um ihre Obeflächendeterminanten für die Bindung von Hammelerythrozyten zu eliminieren, trypsiniert worden, d. h. 0,5 ml Erythrozytensediment war in 10 ml 0,25%iger Trypsinlösung (Trypsin, Serva, Deutschland) 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert worden.

Die EA-IgM Komplexe wurden schließlich mit den Complementkomponenten in der Sequenz C₁, C₄, C₂, C₃ (Cordis, USA) beladen und so die C₃b-Komponente dargestellt (EA-IgM-C₃b). Die Suspension der Hammelerythrozyten erfolgte in diesem Falle nicht in PBS sondern mit VBS - Glucose gepufferten Lösung. §

§ Zusammensetzung der VBS - Glucose Lösung:

VBS - Stammlösung:

83,00 g NaCl

10,19 g 5,5Diäthylbarbitursäure Natriumsalz

auf 2000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt (pH 7,3 - 7,4 mit 1n HCl eingestellt)

VBS - Glucose:

100 ml VBS - Stammlösung

100 ml Aqua dest.

5 g Glucose

Die Methodik der Hammel- und Complementrezeptor Rosettierung ist im Detail andersorts beschrieben (16).

d. Membrangebundenes Immunglobulin

Für die Bestimmung membrangebundenen Immunglobulins - dem klassischen B-Zell Marker - wurden 500 µl der auf $2,5 \times 10^6$ /ml eingestellten Zellsuspension in ein Eppendorf - Röhrchen (Eppendorf, Deutschland) pipettiert und 3 Min. bei 400 x g mit der Hettich - Micro-liter Zentrifuge (Hettich, Deutschland) pelletiert. Das Pellet wurde schließlich mit 20 µl entsprechend verdünnter Fluoreszeinisothiocyanat markierter $F(ab')_2$ Fragmente von polyvalenten Ziege - anti - human Immunglobulinen (Kallestad, Deutschland) versetzt und 30 Min. bei 4°C inkubiert. Als Verdünnungsmedium wurde PBS-BSA mit 0,02 %igem Natriumazid (PBS-BSA-NA) verwendet, um ein Capping der Immunglobuline an der Membran zu verhindern. Nachfolgend wurden die Proben 3 mal in PBS-BSA-NA gewaschen, neuerlich pelletiert und mit 2 %iger Paraformaldehydlösung fixiert und die Membranimmunfluoreszenz unter einem Zeiss UV Mikroskop mit Auflicht (Vergrößerung 10 x 100) auf zumindest 200 Zellen ausgewertet.

e. Zytoplasmatisches Immunglobulin

Für die Bestimmung zytoplasmatischen Immunglobulines wurde die Immunoperoxydase - Methode verwendet. Die Untersuchung erfolgte auf Zytozentrifugenpräparaten (Zytozentrifuge Shandon Elliot, USA).

Die Zellen wurden zunächst in einer Alkoholreihe (Verdünnungsreihe 100 % - 90 % - 70 %, je 3 Min. in jeder Lösung) dehydriert.

Zur Verminderung der endogenen Peroxydaseaktivität in myeloischen Zellen wurden die Präparate über 20 Min. im Methanol + Perhydrol Bad (Lösung: 200 ml Methanol + 2 ml 30 % H_2O_2) 20 Min. behandelt.

Danach wurden sie 10 Min. in einem Puffer[§] (pH 7,4) gewaschen.

[§] Pufferzusammensetzung:

Pro 5 l Aqua dest. wurden genommen:

- 41,0 g Natriumchlorid
 - 4,45 g Natriumhydrogenphosphat 2-Hydrat
 - 3,4 g Kaliumhydrogenphosphat
 - 1,0 g Natriumazid
-

Die komplex - gebundenen Antigene (intrazytoplasmatische Immunglobuline) wurden in einem Bad mit Trypsin und Calcium - Hydrochlorid - 2 - Hydrat (30 Min. bei 37°C) demaskiert. Die hierzu verwendete Lösung § wurde mit 1n Natronlauge auf pH 7,8 alkalisiert.

§ Zusammensetzung der Lösung:

- 100 mg Calcium - Hydrochlorid - 2 - Hydrat
 - 100 mg Trypsin
 - 100 ml Puffer
-

Die Präparate wurden dann erneut 10 Min. im Puffer (pH 7,4) gewaschen.

Zur Verminderung unspezifischer Hintergrundfärbung wurden die Präparate mit 200 µl Schaf Normal Serum (Tierklinik, FUB) behandelt. Das Serum war vorher wie oben beschrieben inaktiviert und 1:5 verdünnt worden.

Während der nächsten 30 Min. wurden die Präparate mit einem 1:100 verdünnten monospezifischen Kaninchen - anti - human IgM Antiserum (Dako, Dänemark) bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach 30 minütigem Waschen im Puffer wurden die Präparate schließlich mit einem polyvalenten Schwein - anti - Kaninchen Antiserum (Dako, Dänemark) überschichtet.

Nach erneutem Waschen (10 Min.) erfolgte eine Inkubation der Präparate mit 1:100 verdünntem Peroxidase - anti - Peroxidase Komplex über 30 Min.

Es folgte ein letzter Waschgang. Schließlich wurde das Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidine (Walter KG, Deutschland) + H_2O_2 dargestellt. Hierbei wurden 10 mg Diaminobenzidine mit 20 ml Puffer (pH 7,6) und 10 μl 30 % H_2O_2 gelöst.

Es erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Meyers Hämatoxylin (Sigma, Deutschland).

Wenn nicht anders angegeben entstammten die hierfür gebrauchten Reagenzien der Firma Merck, Deutschland.

Eine detaillierte Beschreibung der Bestimmungsmethode für zytoplasmatisches Immunglobulin befindet sich andersorts (17).

f. Monoclonale Antikörper

Die Tabelle 2. gibt eine Übersicht über die in dieser Studie verwendeten monoclonalen Antikörper, ihre Spezifität, Reaktionsmuster und Bezugsquelle.

Tabelle 2. Monoclonale Antikörper

Gruppe	Typ	Reaktivität/Antigen	Quelle	Literatur
cALLA	VIL-A1	cALLA	Dr. Knapp	Knapp(18)
nicht linien restringiert	L 243 OKT 9 OKT 10	monomorphes HLA-DR (Ia) Transferrin Rezeptor proliferationsassoziiertes Antigen	Becton-Dickinson Ortho	Lampson(19) Goding(20) Kung(21)
T - Zellen	OKT 3 OKT 4 OKT 6 OKT 8 OKT 11 Lyt 2 WT 1	reife T-Zellen Helfer/Inducer T-Zellen corticale Thymozyten zytotoxische/Suppressor T-Zellen E-Rosetten assoziiertes Antigen Thymozyten, reife T-Zellen einige maligne B-Zellen alle Thymozyten, Subpopulationen reifer T-Zellen	Ortho New England Nuclear Dr. Tax	Reinherz(22) Verbi(23) Kamoun (24) Herrmann (25) Tax(26)
B - Zellen	B 1 B 2 BA 1 BA 2 Y 29/55	alle B-Zellen B-Subpopulationen alle B-Zellen B-Subpopulationen Sig-positive B-Zellen	Coulter Electronics Hybritech Dr. Werner	Nadler(27) Abramson(28) Kersey(29) Forster(30)
myelo-monozytär	OKM 1 VIM-D5	monozytäre Zellen, Granulozyten, Null-Zellen myeloische Reihe ab Promyelozytenstadium, monozytäre Zellen	Ortho Dr. Knapp	Beard(31) Knapp(32)

Der Autor dankt Dr. Knapp, Dr. Tax und Dr. Werner für Bereitstellung ihrer monoclonalen Antikörper

Die Blastenmembranantigendifferenzierung mit monoclonalen Seren erfolgte in analogen Weise wie unter membrangebundenem Immunglobulin beschrieben, mit geringen Modifikationen. Sie sind im Detail andersorts beschrieben (33). Es wurden hier insgesamt 800 μ l der auf $2,5 \times 10^6$ /ml eingestellten Zellsuspension pelletiert und mit den entsprechend verdünnten monoclonalen Antikörper 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach 3 maliger Waschung in PBS-BSA-NA wurden die Zellen erneut pelletiert und für weitere 30 Min. mit einem Fluoreszeinmarkierten Ziege - anti - Maus F(ab')₂ Antikörper (Cappel, USA) für weitere 30 Min. inkubiert und schließlich erneut 2 mal im PBS-BSA gewaschen und repelletiert und in 2%igem Paraformaldehyd fixiert. 25 μ l des Pellets wurden auf einen Objektträger transferiert, mit einem Deckglas eingedeckt und die Membranfluoreszenz wie oben beschrieben ausgewertet.

g. Bestimmung der terminalen Desoxynucleotidyl - Transferase

Die Bestimmung der terminalen Desoxynucleotidyl - Transferase (TdT) erfolgte nach der von Bollum angegebenen Methode (34) im immunologischen Assay. Hierzu wurden Zytozentrifugate 30 Min. in eiskaltem Methanol fixiert und in PBS über 10 Min. rehydriert. 15 μ l eines affinitätschromatographisch gereinigten Kaninchen - anti-Kalb TdT (PL-Biochemicals, USA) auf das Zytozentrifugat überschichtet und 30 Min. in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert, schließlich 2 mal über je 5 Min. in PBS gewaschen und erneut über 30 Min. in der feuchten Kammer mit einem Ziege - anti - Kaninchen IgG - Fluoreszeinzyanat - Konjugat (PL-Biochemicals, USA) inkubiert. Nach weiteren 2 je 5 minütigen Waschgängen in PBS wurden die Präparate in PBS-Glyzerin (10% PBS in Glyzerin) eingedeckt und die Kernfluoreszenz mikroskopisch wie oben für Membranfluoreszenz beschrieben ausgewertet.

Das in der Abbildung 2. dargestellte Schema stellt die Kriterien der immunologischen Diagnostik mit den oben angesprochenen Markern dar.

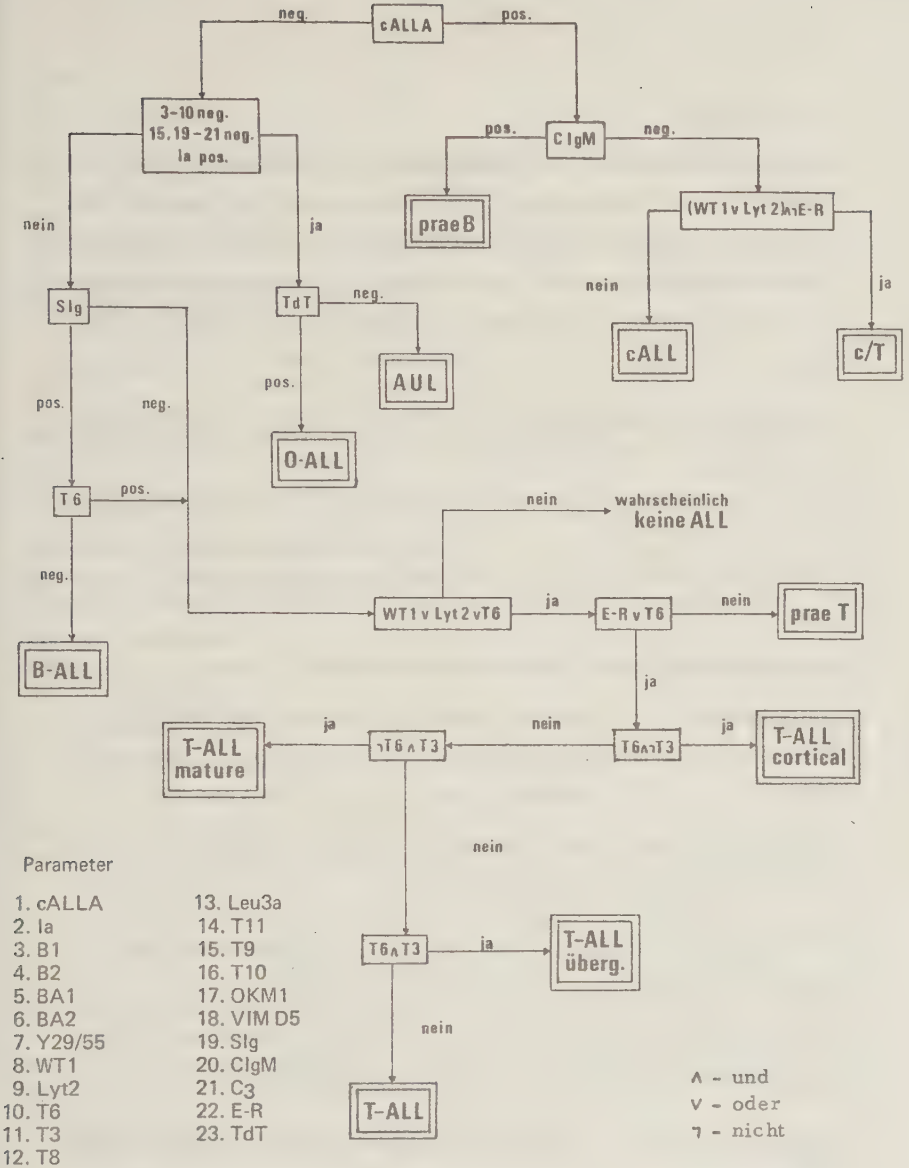


Abb. 2

Diagnostisches Arbitrationsschema basierend auf dem Reaktionsmuster akuter lymphoblastischer Leukämien mit immunologischen Zellmarkern

2. Morphologie

Die Präparate wurden für die gesamte Studie einheitlich in der Studienzentrale in der Kinderklinik Charlottenburg der FUB beurteilt. Die allgemeinmorphologischen Kriterien entsprachen den Grundlagen der FAB - Klassifikation (35). Die Tabelle 3. gibt eine summarische Übersicht über die morphologischen Kriterien der FAB - Klassifikation.

Tab. 3

Morphologische Kriterien der FAB - Klassifikation (Lymphoblastische Leukämien).

L 1

Zellen vorwiegend klein (bis zweifach Lymphozytengröße), Größe wenig variierend.

Zellkerne regelmäßig, Einkerbung oder Faltung selten.

Kernchromatin fein verteilt, in kleineren Zellen auch verklumpt, Nukleolen selten sichtbar, wenn erkennbar, dann klein und unauffällig.

Zytoplasma schmal, hell, Basophilie ungewöhnlich, hohe Kern-Plasmarelation.

Zellen charakteristischerweise einförmig im Hinblick auf alle angegebenen Merkmale.

L 2

Zellen größer als L 1, oft starke Größenvariabilität.

Zellkerne eingekerbt, eingeschnitten oder gefaltet, Form unregelmäßig.

Kernchromatin fein verteilt bis grob verdichtet, Nukleolen fast immer zu erkennen, nach Zahl und Größe variierend.

Zytoplasma oft breit, Basophilie wechselnd, auch deutlich, selten

Azurgranulation.

Zellen charakteristischerweise variabel in allen aufgeführten Merkmalen.

L 3

Zellen groß und gleichförmig.

Zellkern oval bis rund, regelmäßig,

Kernchromatin dicht und feintüpfelig, ein oder mehrere blasige Nukleolen in den meisten Zellen. Mitoseindex über 5%.

Zytoplasma mittelbreit, den Kern vollständig umschließend, stark basophil, meist vakuolisiert.

Zellen charakteristischerweise gleichförmig in allen angegebenen Merkmalen.

3. Zytochemie

Folgende zytochemische Reaktionen wurden ebenfalls in der Studienzentrale durchgeführt und ausgewertet: Peroxydase (POX), Perjod-Schiff - Säure (PAS), alpha - Naphtyl - Azetat - Esterase (ANAE) und saure Phosphatase (sP). Die zytochemischen Reaktionen erfolgten nach Standardmethoden (36). Als positiv galt eine Probe mit mehr als 20 % Blasten mit einem für das jeweilige Reagenz spezifischen Reaktionsmuster. Da in allen untersuchten Fällen, die in der vorliegenden Studie Berücksichtigung fanden, die POX - Reaktion negativ war, wird auf diese Reaktion im Folgenden nicht weiter eingegangen.

4. Elektronische Zellvolumenbestimmung

In 49 von 140 Fällen wurde in der Studienzentrale eine zellvolumetrische Blastenanalyse durchgeführt. Die Bestimmung des mittleren Blastenvolumens erfolgte nach der Zentralstrahlmethode von Thom(37). Hierzu wurde nach Spontansedimentation der Erythrozyten ca. 20 ul des zellreichen Überstandes in isotone Kochsalzlösung aufgenommen

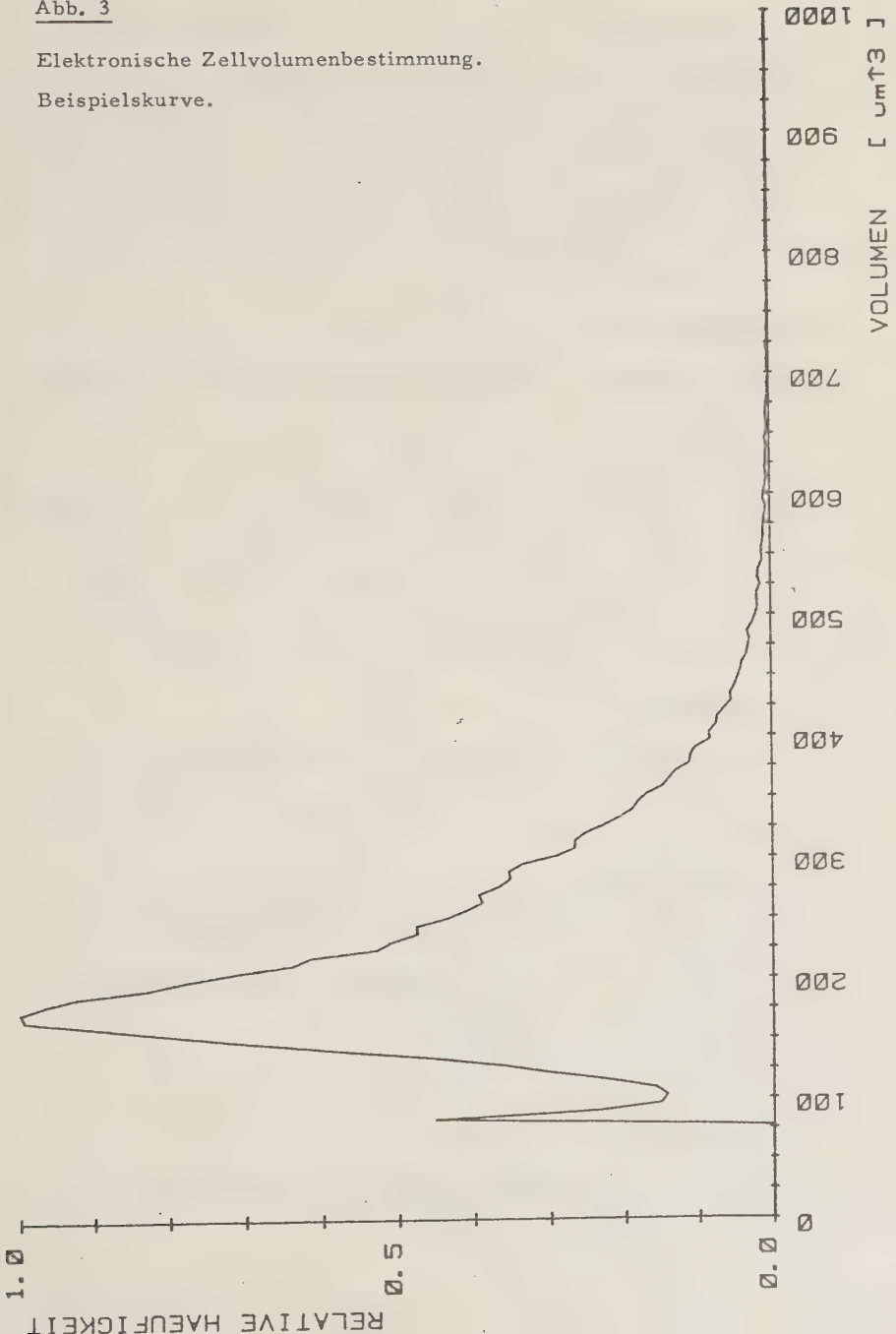
und im elektronischen Messgerät (Coulter Counter, Coulter Electronics, USA) über 2 Min. (1000 Zellen/Sekunde) evaluiert und graphisch aufgetragen.

In der Abbildung 3. ist eine Beispielskurve gezeigt. Der bei ca. $75 \mu\text{m}^3$ liegende kleine Gipfel entspricht kontaminierenden Erythrozyten und Lymphozyten, derjenige bei $180 \mu\text{m}^3$ dem der Blastenpopulation.

Abb. 3

Elektronische Zellvolumenbestimmung.

Beispielskurve.



5. Hämatologische Laborbefunde

Die hämatologischen Laborbefunde bei Diagnosestellung wurden in den behandelnden Kliniken bestimmt und in dem zentralen Rechner in Berlin eingespeichert. Als Mindestaufforderung war hierbei der Hämoglobinwert (in g%), die periphere Leukozytenzahl (in mm^3), der periphere Blastengehalt (in Relativprozent) und die Thrombozytenzahl (in mm^3) erwartet.

6. Organbefall

Die Feststellung von leukämischen Organmanifestationen erfolgte nach den in dem Studienprotokoll vorgesehenen Richtlinien, wobei die Organgröße von Leber, Milz sowie auch der Nieren sonographisch festgestellt wurden. Skelett und Thymusbefall wurde durch native Röntgendiagnostik ermittelt. Zur Evaluierung eines primären ZNS - Befalles erfolgte in allen Fällen eine Lumbalpunktion. Bei einer Pleozytose von mehr als 5 Drittel Zellen erfolgte zur genaueren morphologischen Beurteilung eine Anreicherung mit Hilfe der Zytocentrifuge.

7. Risikofaktor

Zur Abschätzung der Tumormasse und dem hiermit assoziierten individuellen Risiko wurde von der Studienleitung ein Risikofaktor in folgender Formel berechnet:

Risikofaktor (RF) = $0,2 \log (\text{absolute Blastenzahl im peripheren Blut} + 1) + 0,06 \times \text{Lebergröße in cm} + 0,09 \times \text{Milzgröße in cm}$

Der Risikofaktor wurde bei allen Patienten ermittelt. Es erfolgte eine Einteilung in drei Risikogruppen:

- die Gruppe mit niedrigem Risiko - $\text{RF} < 1,2$
- die Gruppe mit mittlerem Risiko - $\text{RF } 1,2 - 1,7$
- die Hochrisiko Gruppe - $\text{RF} > 1,7$

Diese Gruppierung stellt die Grundlage für unterschiedliche therapeutische Varianten im BFM - Protokoll dar.

8. Statistische Analyse

Zur statistischen Datenauswertung wurde eine elektronische Datenverarbeitungsanlage benutzt: Tischrechner des Typs Hewlett - Packard 9825 (Hewlett - Packard, USA) mit Peripheriegeräten (Matrixdrucker, Plotter und 3 "Floppy - disk" Laufwerke als Massenspeicher). Neben den ohnehin eingegebenen Daten wurden speziell für die Bearbeitung der immunologischen Daten neue Programme entwickelt.

Als Methode der statistischen Analyse diente der Life - Table - Algorithmus (38) und der Wilcoxon - Test (39, 40, 41).

III. ERGEBNISSE

A. IMMUNOLOGISCHE SUBKLASSIFIZIERUNG DER ALL

Die immunologische Phänotypisierung erlaubte eine Subklassifizierung der ALL in die Untergruppen common ALL (cALL), common/T-ALL (c/T-ALL), prae T-ALL, T-ALL, prae B - B-ALL, B-ALL, O-ALL und akute immunologisch unklassifizierbare Leukämie (AUL).

Die Verteilung der Leukämien auf die einzelnen Subtypen ist in Tabelle 4. prozentual und in Abbildung 4. synoptisch dargestellt.

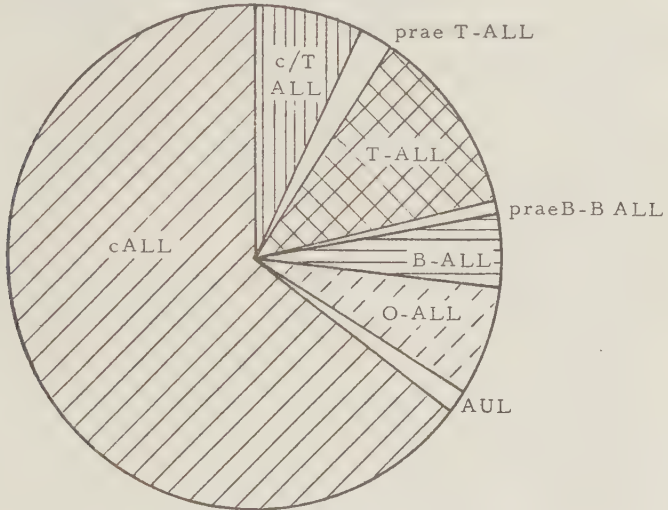
Tab. 4

Anteil der verschiedenen immunologischen Subtypen

Subtyp	n	%n
common ALL	90	64,3
common/T-ALL	10	7,1
prae T-ALL	3	2,1
T-ALL	17	12,1
prae B - B-ALL	1	0,7
B-ALL	7	5,0
O-ALL	10	7,1
AUL	2	1,4
Gesamtgruppe	140	100,0

Abb. 4

Anteil der verschiedenen immunologischen Subtypen



Dabei liessen sich folgende Markermuster zu einem entsprechend definierbaren Leukämiephänotyp zusammenfassen:

Die common ALL ist immunologisch charakterisiert durch Reaktion mit dem anti - cALLA Serum (Median bei 68% der Blasten, Streubereich 2/3 der Fälle: 16. Perzentile bei 40%, 84. Perzentile bei 89%), durch Expression monomorpher HLA-DR - Determinanten (Ia-Antigene) (66% Median, 16. Perzentile bei 40%, 84. Perzentile bei 87%), sowie durch Nachweis intranukleärer TdT (86% Median, 16. Perzentile bei 67%, 84. Perzentile bei 94%). In variablem Maße reagieren hier die "frühen" B - Antikörper: BA1 (56% Median, 16. Perzentile bei 30%, 84. Perzentile bei 80%) und B1 (18% Median, 16. Perzentile bei 11%, 84. Perzentile 43%). Andere anti-B, anti-T, anti-myelo- und monozytäre Seren, membrangebundenes Immunglobulin, E_N - Rosetten und Complementrezeptoren waren hier negativ (Abbildung 5).

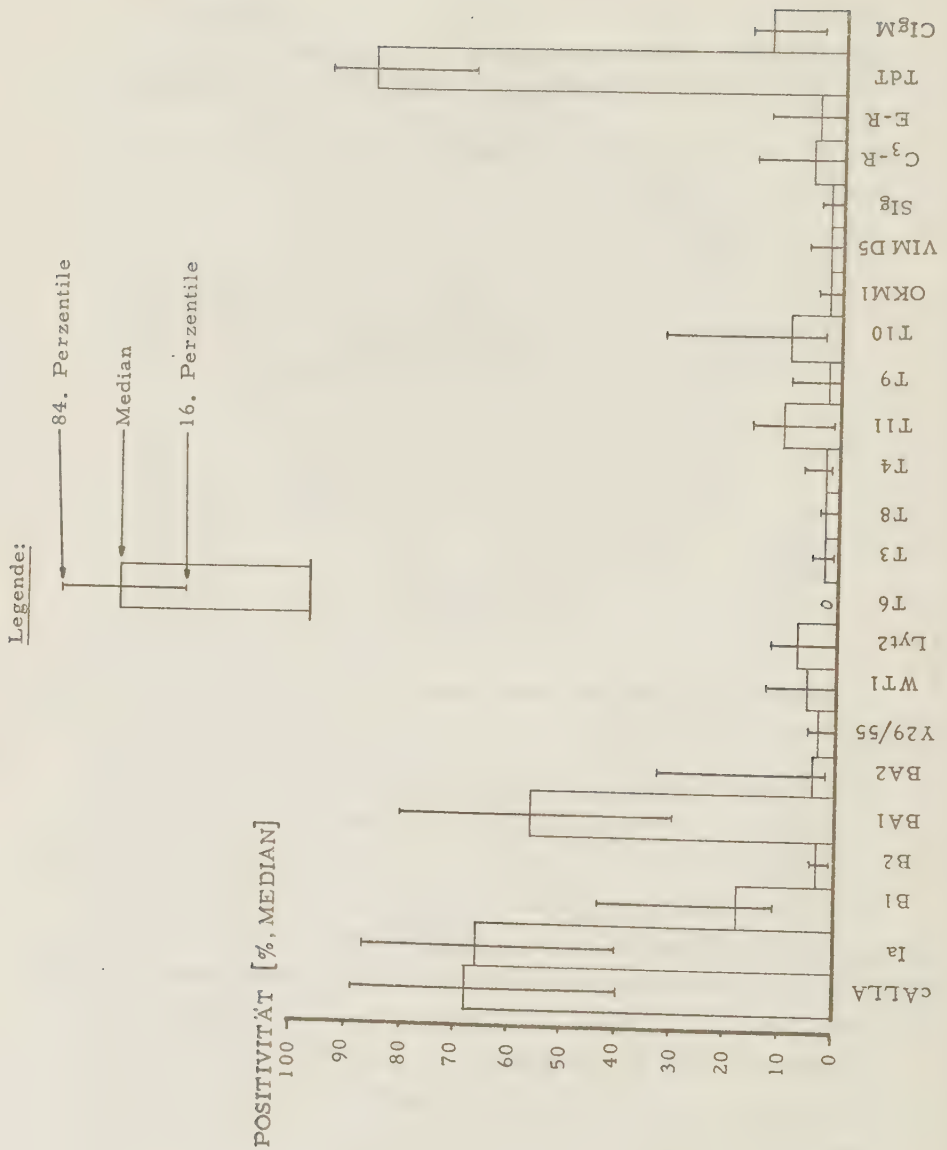


Abb. 5

Reaktion verschiedener monoklonaler und nicht monoklonaler Marker mit akuten lymphoblastischen Leukämien vom common - Typ

Die common/T-ALL entspricht in ihrem common Muster der üblichen common ALL, weist jedoch Merkmale der beginnenden Differenzierung in die T-Linie auf, wie sie durch die Antikörper WT 1 (35% Median, 16. Perzentile bei 20%, 84. Perzentile bei 60%), Lyt 2 (19% Median, 16. Perzentile bei 15%, 84. Perzentile bei 28%), OKT 10 (28% Median, 16. Perzentile bei 19%, 84. Perzentile bei 35%) und zum Teil die Expression der Complementrezeptoren (32% Median, 16. Perzentile bei 26%, 84. Perzentile bei 40%) zum Ausdruck kommt (Abbildung 6).

Die prae T-ALL ist nicht mehr mit anti cALLA und anti Ia reagibel, bleibt TdT positiv (92% Median, 16. Perzentile bei 89%, 84. Perzentile bei 95%). Hier dominiert der "frühe" T - Marker WT 1 (Median bei 91%, 16 Perzentile bei 21%, 84. Perzentile bei 60%) häufig kombiniert mit Lyt 2 (57% Median, 16. Perzentile bei 15%, 84. Perzentile bei 29%) Reaktion, sowie in variablem Ausmaß Reaktion mit OKT 9 (5% Median, 16. Perzentile bei 3%, 84. Perzentile bei 19%) und OKT 10 (19% Median, 16. Perzentile bei 2%, 84. Perzentile bei 55%). Marker die die reiferen Stufen der T - Differenzierung erkennen bleiben hier negativ (OKT 6, OKT 3, OKT 4, OKT 8) (Abbildung 7).

Die T-ALL Fälle waren charakterisiert durch Expression des WT 1 (79% Median, 16. Perzentile bei 69%, 84. Perzentile bei 87%), Lyt 2 (55% Median, 16. Perzentile bei 15%, 84. Perzentile bei 79%), OKT 6 (29% Median, 16. Perzentile bei 9%, 84. Perzentile bei 67%), partiell OKT 3 (15% Median, 16. Perzentile bei 3%, 84. Perzentile bei 20%), OKT 8 (27% Median, 16. Perzentile bei 10%, 84. Perzentile bei 38%), OKT 4 (14% Median, 16. Perzentile bei 12%, 84. Perzentile bei 40%), OKT 11 (64% Median, 16. Perzentile bei 59%, 84. Perzentile bei 78%), OKT 9 (10% Median, 4% 16. Perzentile, 26% 84. Perzentile) und OKT 10 (24% Median, 16. Perzentile bei 19%, 84. Perzentile bei 48%) definierten Antigens, partielle Expression von Complementrezeptoren (26% Median, 16. Perzentile bei 18%, 84. Perzentile bei 47%), Rosettierbarkeit mit Hammelerythrozyten (26% Median, 16. Per-

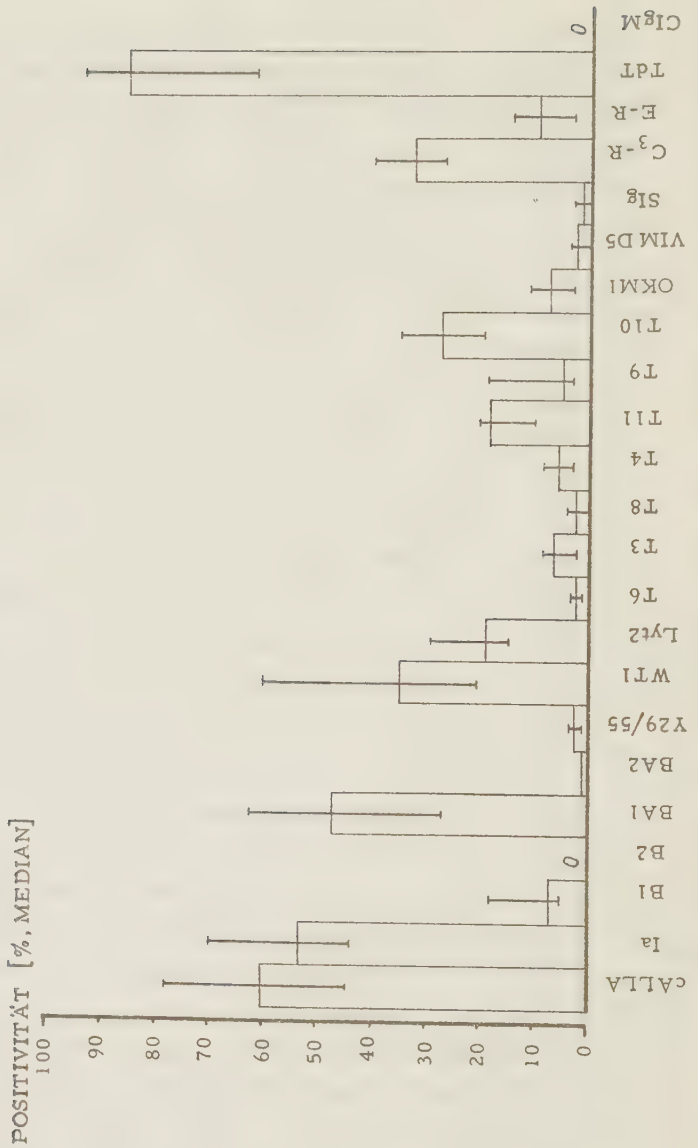


Abb. 6

Reaktion verschiedener monoclonaler und nicht monoclonaler Marker mit akuten lymphoblastischen Leukämien vom common/T Typ

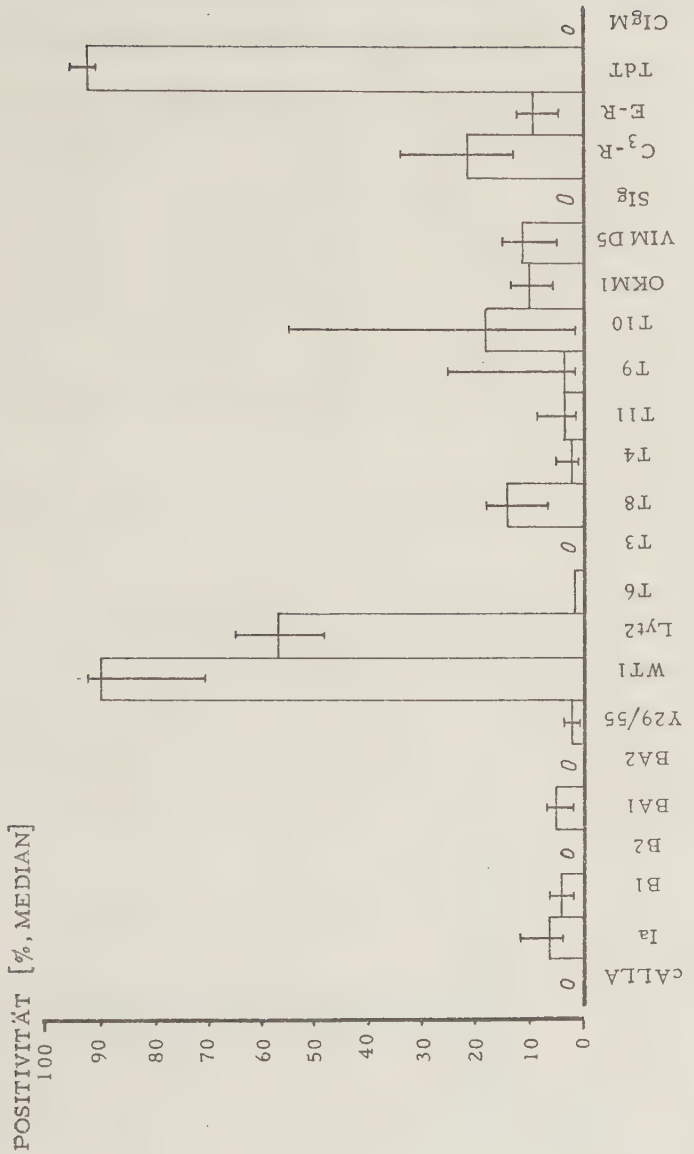


Abb. 7

Reaktion verschiedener monoklonaler und nicht monoklonaler Marker mit akuten lymphoblastischen Leukämien vom prae T Typ

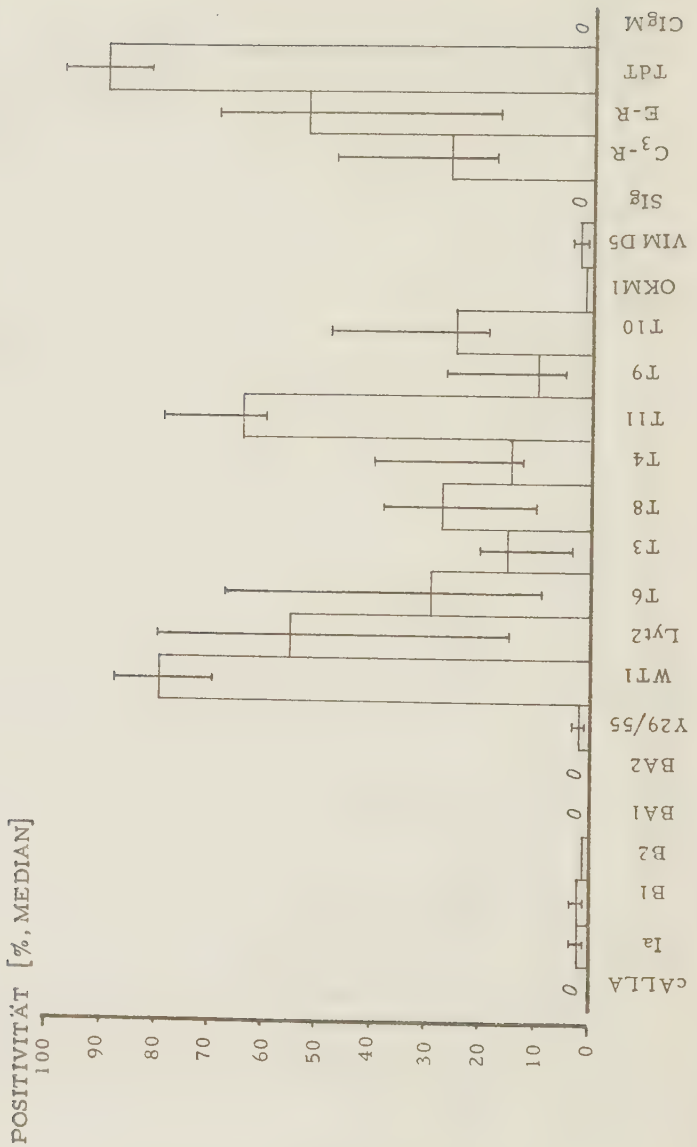


Abb. 8

Reaktion verschiedener monoclonaler und nicht monoclonaler Marker mit akuten lymphoblastischen Leukämien vom T Typ

zentile bei 18%, 84. Perzentile bei 47%) und deutliche TdT Positivität (90% Median, 16. Perzentile bei 82%, 84. Perzentile bei 98%).

Eine weitere Subtypisierung der insgesamt 17 T-ALL Fälle war auf der Basis der individuellen Reaktionsmuster möglich. Es konnten so 2 Fälle als Übergangsformen prae T-ALL in corticalen T-ALL Typ definiert werden (OKT 6 Marker noch nicht exprimiert), 11 Fälle entsprachen dem typischen corticalen T-ALL Typ (Expression des OKT 6 Markers, OKT 3 noch nicht reagibel), 2 Fälle entsprachen der Übergangsphase vom corticalen zum reiferen medullären Typ (Koexpression des OKT 6 und OKT 3 Markers) und 2 weitere entsprachen dem reifen medullären Typ (Negativität des OKT 6 Markers, Reaktion mit OKT 3).

Interessant war in einem Falle die Koexpression von cALLA mit dem corticalen Thymozyten Marker OKT 6 (Abbildung 8).

Als prae B - B-ALL wurde ein Fall definiert mit Expression von zytoplasmatischem (52% der Blasten) und membrangebundenem (30%) Immunglobulin, Ia (59%), BA 1 (47%) und B 1 (35%) wie Y 29/55 (33%). cALLA und TdT waren negativ. Andere Marker entsprachen hier einer Kontamination durch anwesende Restgranulopoese bzw. kontaminierende periphere T - Lymphozyten, bzw. weitere Marker des Panels konnten wegen unzureichender Zellzahl nicht untersucht werden (Abbildung 9).

Die B-ALL ist Ia (61% Median, 16. Perzentile bei 52%, 84. Perzentile bei 71%) und Sig (65% Median, 16. Perzentile bei 59%, 84. Perzentile bei 70%) positiv und reagiert mit den monoclonalen anti B Seren B 1 (54% Median, 16. Perzentile bei 49%, 84. Perzentile bei 55%), BA 1 (49% Median, 16. Perzentile bei 40%, 84. Perzentile bei 68%), Y 29/55 (51% Median, 16. Perzentile bei 41%, 84. Perzentile bei 64%). Anti B Seren B 2 und BA 2 waren in dem hiesigen Untersuchungsgut nicht reagibel. Die nähere Typisierung des membrangebundenen Immunglobulins mit monovalenten Seren zeigte in 6 Fällen ein Mem-

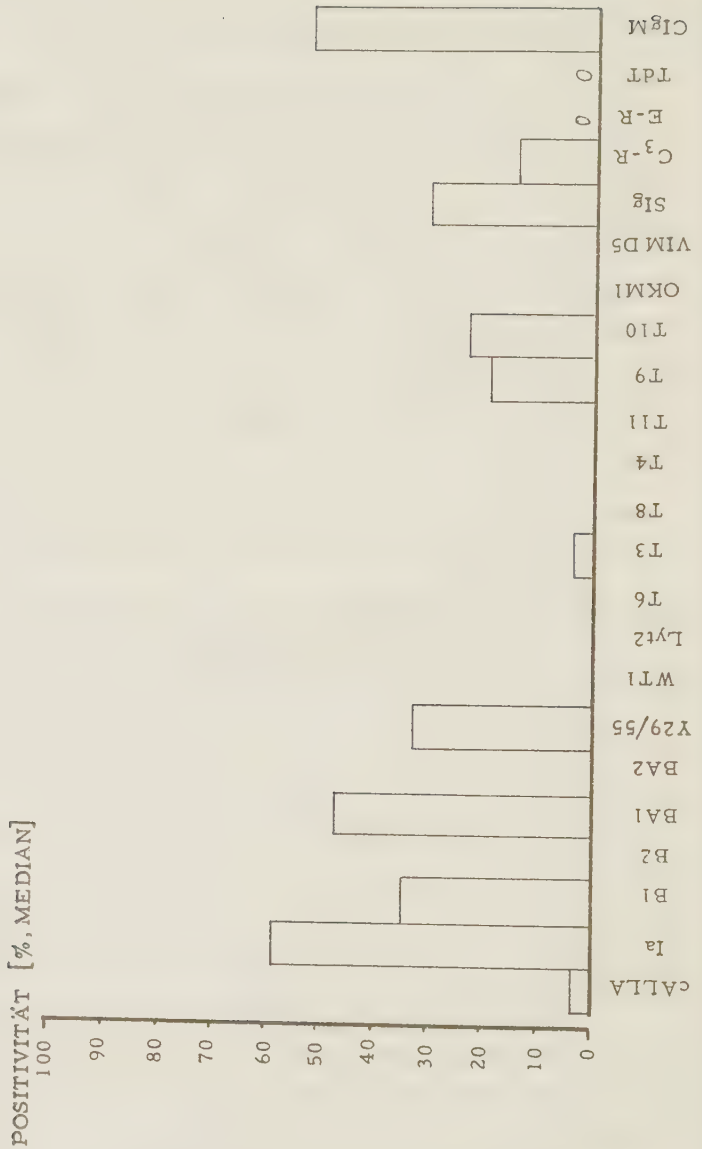


Abb. 9

Reaktion verschiedener monoclonaler und nicht monoclonaler Marker mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom prae B - B Typ

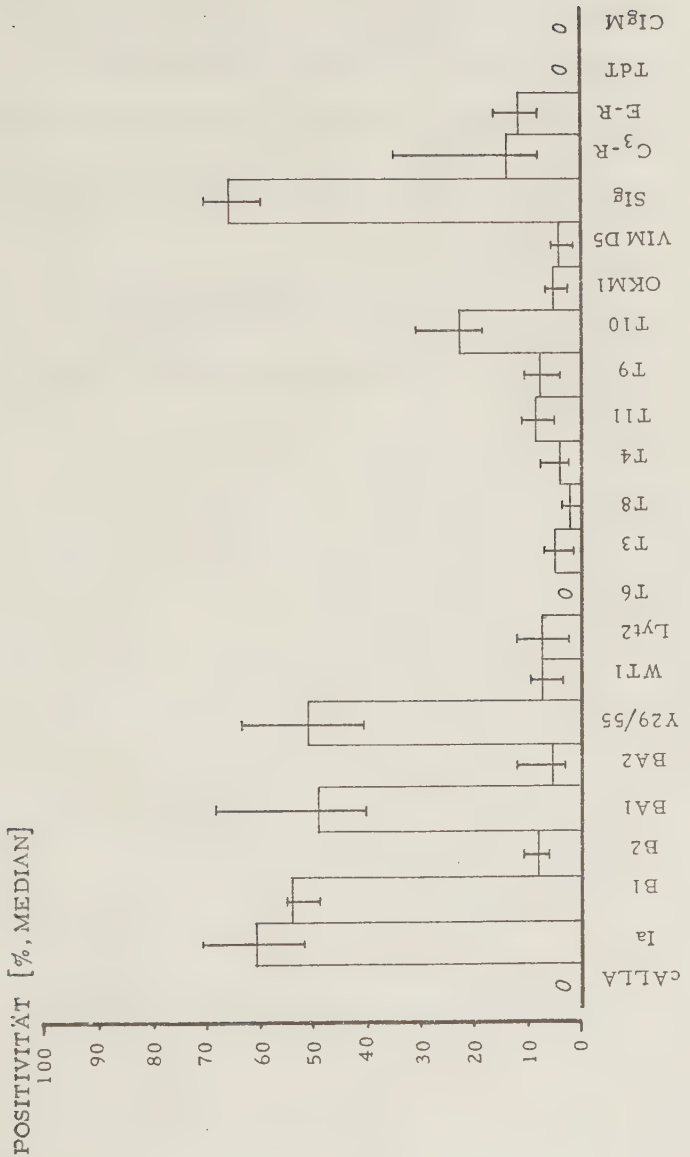


Abb. 10

Reaktion verschiedener monoklonaler und nicht monoklonaler Marker mit akuten lymphoblastischen Leukämien vom B Typ

bran - IgM, in einem Fall ein Membran - IgG Schwerkettentyp. Es bestand eine Leichtkettenrestriktion auf kappa - Ketten in 5 und auf lambda - Ketten in 2 Fällen (Abbildung 10).

Die O-ALL entstammt einem ausschließlich TdT (68% Median, 16. Perzentile bei 41%, 84. Perzentile bei 84%) und Ia (60% Median, 16. Perzentile bei 24%, 84. Perzentile bei 72%) positiven Blastentyp (Abbildung 11).

Als AUL (akute immunologisch unklassifizierbare Leukämie) werden markerlose, zytochemisch jedoch sicher POX - negative Blasten, allenfalls mit Ia - Antigen Expression (34% Median) verstanden (Abbildung 12).

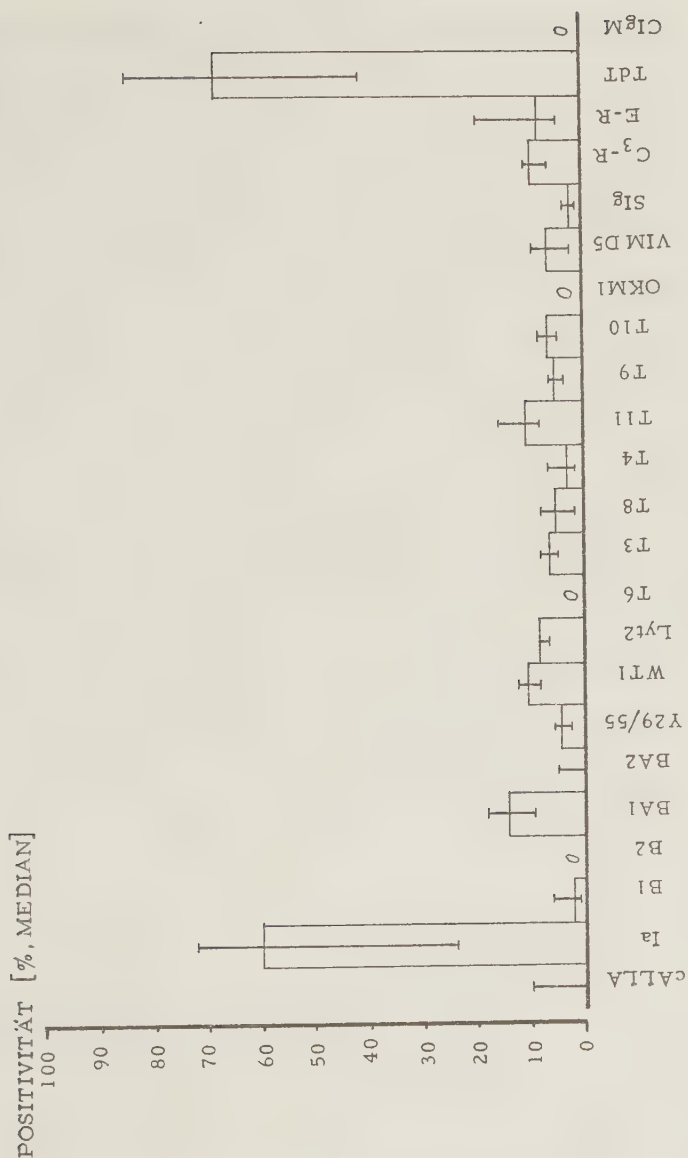


Abb. 11

Reaktion verschiedener monoclonaler und nicht monoclonaler Marker mit akuten lymphoblastischen Leukämien vom O Typ

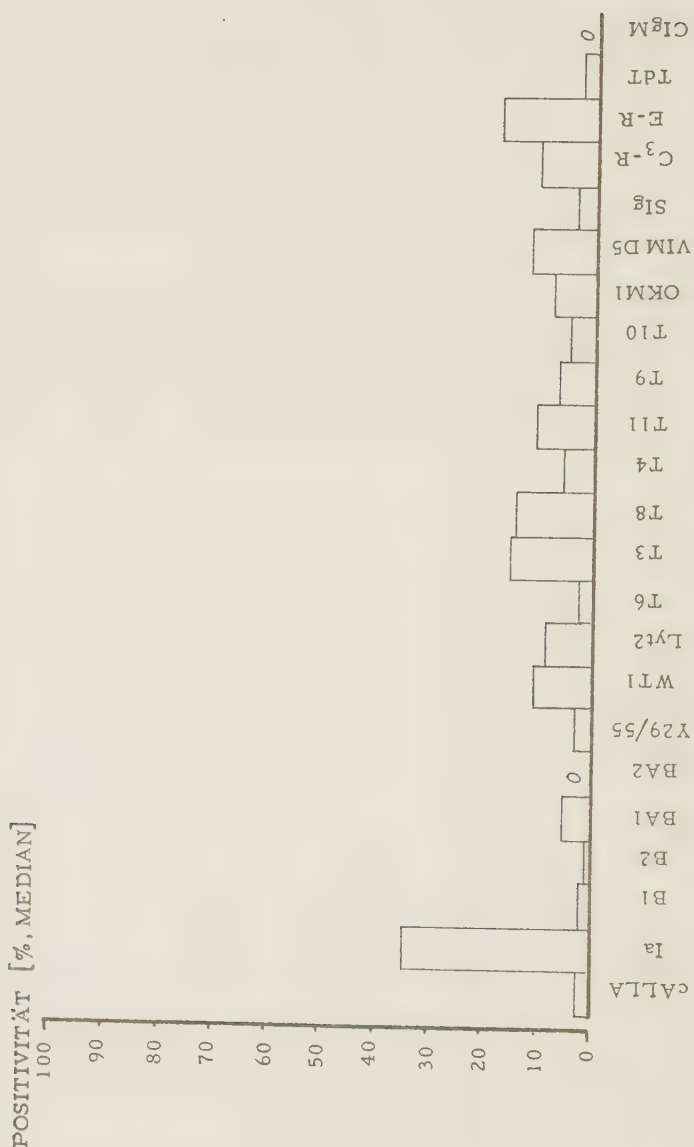


Abb. 12

Reaktion verschiedener monoklonaler und nicht monoklonaler Marker
mit akuter immunologisch unklassifizierbarer Leukämie

B. MULTIPARAMETERANALYSE DER IMMUNOLOGISCH ETABLIERTEN SUBGRUPPEN

Bei einer Multiparameteranalyse wurden die einzelnen immunologisch etablierten Subgruppen mit der Alters- und Geschlechtsverteilung, den morphologischen und zytochemischen Daten, den zytovolumetrischen Daten, Organmanifestationen, dem errechneten Risikofaktor sowie den initialen hämatologischen Daten korreliert.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5 bis 13 dargestellt. Die hierzu korrespondierenden statistischen Daten sind in Tabellen 14 bis 21 zusammengefasst.

Im Einzelnen ließen sich hierbei folgende Befunde erheben:

Common und common/T-ALL bevorzugten jüngere Lebensalter als andere Subgruppen. Die O-ALL und AUL Subentitäten waren bezüglich der Alterverteilung inhomogen. Das männliche Geschlecht war insgesamt dominierend, wobei dies am stärksten in der T-ALL und B-ALL Gruppe ausgeprägt war. In der prae T- und O-ALL Gruppe - obgleich hier die geringe Fallzahl zu berücksichtigen ist - ergab sich eine Bevorzugung des weiblichen Geschlechtes (Tabelle 5).

Tab. 5

Alters- und Geschlechtsverteilung bezogen auf immunologische Subtypen

Subtyp	ALL	cALL	c/T	praeT	T-ALL	praeB-B	B-ALL	O-ALL	AUL
n	140	90	10	3	17	1	7	10	2
%n	100	64,3	7,1	2,1	12,1	0,7	5,0	7,1	1,4
		71,4		14,2		5,7		8,5	
medianaes Alter (Monate)	69,5	55,5	49	110	104	(116)	128	126,5	73
Standard- abweichung (±)	51	45	36	35	51	-	52	66	88
Geschlecht ♂/♀	84/56	55/35	7/3	1/2	11/6	1/0	4/3	3/7	2/0
%/%	60/40	61/49	70/30	33/67	65/35	-	66/34	30/70	-

Im Hinblick auf allgemeinmorphologische Daten fand sich eine hochsignifikante Bevorzugung der L1 Variante (124 von 140 Patienten). In der prae T-ALL Gruppe dominierte jedoch ganz der L2 Typ. Die B-ALL war in allen untersuchten Fällen mit einer L3 Morphologie korreliert (Tabelle 6).

Tab. 6

Korrelation zwischen immunologischen Subtypen und FAB - Klassifikation

Subtyp	ALL	cALL	c/T	praeT	T-ALL	praeBB	B-ALL	O-ALL	AUL
n	140	90	10	3	17	1	7	10	2
L1	124	88	10	0	14	1	0	9	2
L2	9	2	0	3	3	-	0	1	0
L3	7	0	0	0	0	-	7	0	0

Zytochemische Reaktionsmuster zeigten eine Bevorzugung des PAS Typs bei der cALL und der c/T Subentität, gleichwohl auch ein Drittel der O-ALL Gruppe ebenfalls eine grob granuläre PAS Aktivität aufwiesen. 13,5% aller cALL zeigten eine fokale saure Phosphatase Aktivität, die bei allen prae T - Typen und 80,2% der T - Typen identifiziert wurde. Die alpha-Naphtyl-Azetat-Esterase Reaktion fand sich in 10 von 139 Fällen wobei hier die Majorität auf den prae T-ALL Subtyp mit 3 von 3 untersuchten Fällen entfiel (Tabelle 7).

Tab. 7

Korrelation zwischen immunologischen Subtypen und zytochemischen Reaktionsmustern

Subtyp	ALL	cALL	c/T	praeT	T-ALL	praeB	B-ALL	O-ALL	AUL
PAS	70/140	55/90	7/10	0/3	5/17	0/1	0/7	3/10	0/2
sPh	30/138	12/89	0/9	3/3	15/17	0/1	0/7	0/10	0/2
Esterase	10/139	4/90	0/10	3/3	1/17	0/1	0/6	1/10	1/2

(positiv/untersucht)

Die volumetrisch definierte Blastengröße betrug im Mittel - bezogen auf alle untersuchten Patienten - $250 \mu\text{m}^3$. Ein größerer Blastentyp fand sich in 10 von 49 untersuchten Fällen, während 39 von 49 einen Blastentyp unter bzw. gleich $250 \mu\text{m}^3$ aufwiesen. In Übereinstimmung mit der FAB Morphologie überwiegte in der common, der common/T, der O-ALL und AUL ganz der kleine Blastentyp während die prae T und B-ALL in die als volumetrisch größer erkannte Blastensorte zu rubrizieren war (Tabelle 8).

Tab. 8

Korrelation zwischen immunologischen Subtypen und zellvolumetrischen Analyse (Zellvolumina in μm^3)

Subtyp	ALL	cALL	c/T	praeT	T-ALL	praeB-B	B-ALL	O-ALL	AUL
n	49	27	3	3	5	-	3	7	1
≤ 250	39	24	3	0	4	-	0	7	1
> 250	10	3	0	3	1	-	3	0	0

Die Korrelation zwischen immunologischem Subtyp und peripherem Leukozytewert bzw. absolutem Blastengehalt ergab eine Bevorzugung des T-ALL Typs (nicht jedoch in der prae T Gruppe) sowie der O-ALL und AUL Gruppe bezüglich hochleukämischer Verläufe. Die geringsten peripheren Blastenzahlen fanden sich in der c/T - und B-ALL Gruppe (Tabelle 9).

Tab. 9

Verteilung der initialen Leukozytenzahl und des absoluten Blastengehaltes.

Subtyp	ALL	cALL	c/T	praeT	T-ALL	praeB-B	B-ALL	O-ALL	AUL
n	140	90	10	3	17	1	7	10	2
Leukozytenzahl/mm ³									
<10 000	56	40	7	2	1	-	3	2	1
10 000- 50 000	55	38	3	0	6	1	4	3	1
>50 000	29	12	0	1	10	-	0	5	0
Median	15 250	12 200	5 600	9 400	76 000	(36000)	10 300	45 500	147350
Rang	653- 700000	653- 193000	2600- 22000	6700- 66000	9900- 700000	-	5800- 38500	2600- 172000	9700- 285000
absolute Blastengehalt/mm ³									
Median	8420	5550	1800	5400	60500	(28800)	2730	31800	136520
Rang	0- 623000	26- 173700	124- 18920	3666- 48180	8415- 623000	-	110- 7640	0- 156520	5141- 267900

Die niedrigsten Hämoglobinwerte wurden innerhalb der common Gruppe und ihrer c/T Variante gefunden (Tabelle 10).

Tab. 10

Korrelation zwischen immunologischen Subtypen und initialen Hämoglobinwerten (g%)

Subtyp	ALL	cALL	c/T	praeT	T-ALL	praeBB	B-ALL	O-ALL	AUL
n	140	90	10	3	17	1	7	10	2
<10,0	106	76	9	2	9	-	2	7	1
≥10,0	34	14	1	1	8	1	5	3	1
Median	7,9	7,4	8,0	8,9	8,9	(10,9)	10,5	9,0	11,0
Rang	3,3- 13,7	3,3- 13,6	4,9- 11,8	6,5- 10,1	6,0- 13,7	-	7,3- 12,4	6,8- 13,0	9,3- 12,6

Auf die gleichen Entitäten entfielen auch die niedrigsten medianen Thrombozytenwerte (Tabelle 11).

Tab. 11

Korrelation zwischen immunologischen Subtypen und peripheren Thrombozytenzahl/mm³

Subtyp	ALL	cALL	c/T	praeT	T-ALL	praeBB	B-ALL	C-ALL	AUL
n	140	90	10	3	17	1	7	10	2
<50 000	67	48	6	1	6	1	2	3	0
≥50 000	73	42	4	2	11	-	5	7	2
Median	50 000	42 000	31 000	133000	55 000	(13000)	80 000	73 000	190000
Rang	5000- 417000	5000- 400000	5000- 417000	22000- 162000	10000- 131000	-	10000- 319000	14000- 279000	15000- 230000

Die ausgeprägtesten Organvergrößerungen sowohl in der Leber als auch der Milz wurden innerhalb der T-ALL Gruppe festgestellt. Die geringste Hepatosplenomegalieinzidenz fand sich in der B-ALL Gruppe.

Thymusbefall war ganz mit T - Marker Expression korreliert. 2 von 3 prae T- und 11 von 17 T-ALL Fälle zeigten eine thymische Masse. Überraschenderweise war auch in einem der beiden unklassifizierten Typen eine Thymusvergrößerung radiologisch objektivierbar.

Die ausgeprägtesten Lymphadenopathien fanden sich in der T-ALL und O-ALL Gruppe.

Zentrallnervöse - meningeale Manifestationen waren am ausgeprägtesten mit dem T- und dem B - Typ assoziiert (Tabelle 12).

Tab. 12

Korrelation zwischen immunologischen Subtypen und Organmanifestation

Subtyp	ALL	cALL	c/T	praeT	T-ALL	praeBB	B-ALL	O-ALL	AUL
Lebervergrößerung	116/140	77/90	7/10	3/3	15/17	1/1	5/7	7/10	1/2
Median (cm)	4	4	5,5	4	7	(4)	2	3	2
Milzvergrößerung	95/140	60/90	5/5	3/3	16/17	1/1	1/7	8/10	1/2
Median (cm)	3,5	3	2	7	8	(8)	0	4	2,5
Skelett-Befall	27/133	19/87	4/10	1/3	1/14	0/1	1/6	1/10	0/2
Nieren-Befall	37/140	23/90	2/10	0/3	7/17	0/1	4/7	1/10	0/2
Lymphknotenvergrößerung	49/140	29/90	2/10	1/3	10/17	0/1	1/7	6/10	0/2
Thymus-Befall	13/140	0/90	0/10	2/3	11/17	0/1	0/7	0/10	1/2
ZNS-Befall	7/140	1/90	0/10	1/3	3/17	0/1	2/7	0/10	0/2

Die höchsten errechneten Risikofaktorwerte entfielen auf die T-ALL, die prae T-ALL und schließlich die O-ALL und AUL Gruppe, die in sich inhomogen waren (hohe Standardabweichungen). Die B-ALL hat naturgemäß aufgrund ihrer zumeist geringen peripheren Leukozytenwerte die niedrigsten errechneten Risikofaktorwerte (Tabelle 13).

Tab. 13

Korrelation zwischen immunologischen Subtypen und einem errechneten Risikofaktor

Subtyp	ALL	cALL	c/T	praeT	T-ALL	praeB-ll	B-ALL	C-ALL	AUL
n	140	90	10	3	17	1	7	10	2
<1,2	75	57	6	0	1	-	7	2	1
1,2-1,7	54	29	3	3	9	1	0	8	1
>1,7	11	4	1	0	7	-	0	0	0
Median	1,1283	1,0266	1,0896	1,3069	1,6581	(1,4519)	0,6873	1,2718	1,1339
Rang	0- 2,0363	0,3773- 2,0351	0,4194- 1,8554	1,2329- 1,3366	0,8603- 2,0363	-	0,4691- 1,1166	0- 1,6023	0,7422- 1,5250
Standard- abweichung (±)	0,4169	0,3668	0,4888	0,0534	0,2981	-	0,2385	0,4912	0,5529

Die statistische Analyse der Korrelation der immunologischen Subtypen mit den beschriebenen Parametern (Tabellen 5 bis 13) ergab aufgrund des Wilcoxon - Testes folgende Signifikanzen:

Die common ALL Patienten sind hochsignifikant jünger als die mit T-ALL und signifikant unter dem Alter der B-ALL und O-ALL Gruppe angesiedelt. c/T-ALL Patienten erwiesen sich ebenfalls als signifikant jünger als die T-ALL und O-ALL Patienten (Tabelle 14).

Tab. 14

Signifikanzkorrelation der verschiedenen immunologischen Subtypen bezogen auf Alter (Wilcoxon - Test)

cALL	c/T	praeT	T-ALL	B-ALL	O-ALL	
-	n. s.	n. s.	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	cALL
	-	n. s.	$p < 0,01$	n. s.	$p < 0,01$	c/T
		-	n. s.	n. s.	n. s.	praeT
			-	n. s.	n. s.	T-ALL
				-	n. s.	B-ALL
					-	O-ALL

Patienten mit T-ALL zeigten hochsignifikant höhere periphere Leukozytenwerte als Kinder mit common ALL und c/T-ALL Typen. Auch die O-ALL Patienten wiesen signifikant höhere periphere Leukozytenwerte als die common und die c/T Gruppe auf (Tabelle 15).

Tab. 15

Signifikanzkorrelation der verschiedenen immunologischen Subtypen bezogen auf initiale periphere Leukozytenwerte (Wilcoxon - Test)

cALL	c/T	praeT	T-ALL	B-ALL	O-ALL	
-	n.s.	n.s.	$p \ll 0,01$	n.s.	$p < 0,01$	cALL
	-	n.s.	$p \ll 0,01$	n.s.	$p < 0,01$	c/T
		-	n.s.	n.s.	n.s.	praeT
			-	$p < 0,01$	n.s.	T-ALL
				-	n.s.	B-ALL
					-	O-ALL

Analog den peripheren Leukozytenwerten ergaben sich Signifikanzen bezüglich der absoluten peripheren Blastenzahl (Tabelle 16).

Tab. 16

Signifikanzkorrelation der verschiedenen immunologischen Subtypen bezogen auf initiale absolute periphere Blastenzahl (Wilcoxon - Test)

cALL	c/T	praeT	T-ALL	B-ALL	O-ALL	
-	n. s.	n. s.	$p \ll 0,01$	n. s.	$p < 0,01$	cALL
	-	n. s.	$p \ll 0,01$	n. s.	$p < 0,01$	c/T
		-	n. s.	n. s.	n. s.	praeT
			-	$p < 0,01$	n. s.	T-ALL
				-	n. s.	B-ALL
					-	O-ALL

Die Hämoglobinwerte waren in der common ALL Gruppe signifikant niedriger als in der T-ALL, B-ALL und O-ALL Gruppe (Tabelle 17).

Tab. 17

Signifikanzkorrelation der verschiedenen immunologischen Subtypen bezogen auf initiale Hämoglobinwerte (Wilcoxon - Test)

cALL	c/T	praeT	T-ALL	B-ALL	O-ALL	
-	n. s.	n. s.	p < 0, 01	p < 0, 01	p < 0, 01	cALL
	-	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	c/T
		-	n. s.	n. s.	n. s.	praeT
			-	n. s.	n. s.	T-ALL
				-	n. s.	B-ALL
					-	O-ALL

Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich im Vergleich der einzelnen Subentitäten bezüglich der peripheren Thrombozytenwerte (Tabelle 18).

Tab. 18

Signifikanzkorrelation der verschiedenen immunologischen Subtypen bezogen auf initiale periphere Thrombozytenwerte (Wilcoxon - Test)

cALL	c/T	praeT	T-ALL	B-ALL	O-ALL	
-	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	cALL
	-	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	c/T
		-	n. s.	n. s.	n. s.	praeT
			-	n. s.	n. s.	T-ALL
				-	n. s.	B-ALL
					-	O-ALL

Signifikante Lebervergrößerungen fanden sich bei der T-ALL im Vergleich zur cALL, B-ALL und O-ALL Gruppe (Tabelle 19).

Tab. 19

Signifikanzkorrelation der verschiedenen immunologischen Subtypen bezogen auf Lebervergrößerung (Wilcoxon - Test)

cALL	c/T	praeT	T-ALL	B-ALL	O-ALL	
-	n. s.	n. s.	p < 0,01	n. s.	n. s.	cALL
	-	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	c/T
		-	n. s.	n. s.	n. s.	praeT
			-	p < 0,01	p < 0,01	T-ALL
				-	n. s.	B-ALL
					-	O-ALL

Milzvergrößerungen kamen hochsignifikant bei der T-ALL im Vergleich zur c/T-ALL, B-ALL und O-ALL vor (Tabelle 20).

Tab. 20

Signifikanzkorrelation der verschiedenen immunologischen Subtypen bezogen auf Milzvergrößerung (Wilcoxon - Test)

cALL	c/T	praeT	T-ALL	B-ALL	O-ALL	
-	n.s.	n.s.	$p \ll 0,01$	n.s.	n.s.	cALL
	-	n.s.	$p < 0,01$	n.s.	n.s.	c/T
		-	n.s.	n.s.	n.s.	praeT
			-	$p < 0,01$	$p < 0,01$	T-ALL
				-	n.s.	B-ALL
					-	O-ALL

Die T-ALL stellt zudem auch eine Subgruppe mit statistisch hochsignifikant höherem Risikofaktor als die common ALL und B-ALL Gruppe dar und ist auch im Vergleich zur c/T-ALL und O-ALL Gruppe mit einem signifikant höherem Risikofaktor errechenbar (Tabelle 21).

Tab. 21

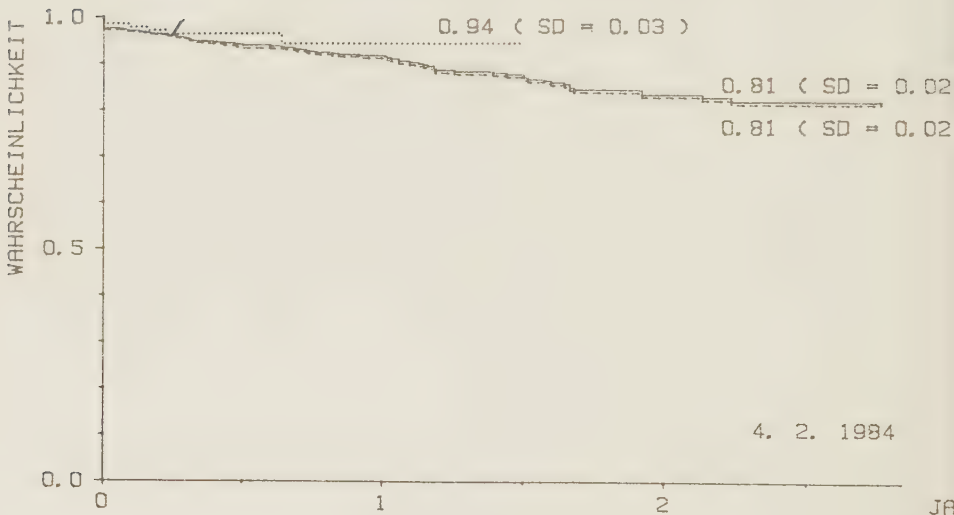
Signifikanzkorrelation der verschiedenen immunologischen Subtypen bezogen auf errechneten Risikofaktor (Wilcoxon - Test)

cALL	c/T	praeT	T-ALL	B-ALL	O-ALL	
-	n.s.	n.s.	$p \ll 0,01$	$p < 0,01$	n.s.	cALL
	-	n.s.	$p < 0,01$	n.s.	n.s.	c/T
		-	n.s.	n.s.	n.s.	praeT
			-	$p \ll 0,01$	$p < 0,01$	T-ALL
				-	n.s.	B-ALL
					-	O-ALL

In den Abbildungen 13 und 14 sind die statistischen Wahrscheinlichkeiten des krankheitsfreien Überlebens und des krankheitsfreien Intervalls der immunologisch untersuchten Patienten mit den Daten der Gesamtstudie verglichen.

Abb. 13

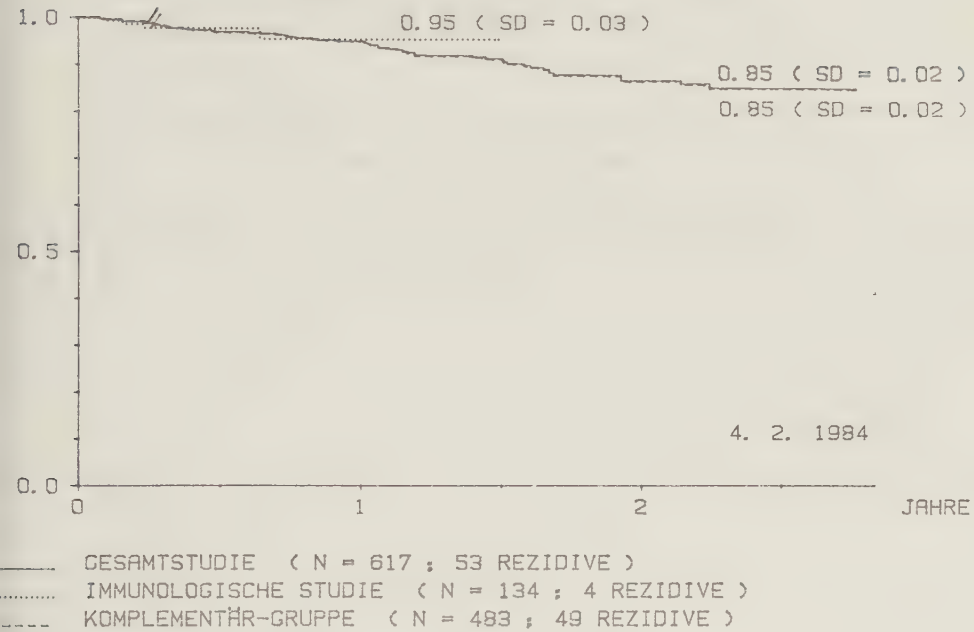
THERAPIESTUDIE ALL-BFM 81/83
KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN



- GESAMTSTUDIE (N = 633 ; 554 IN CCR)
..... IMMUNOLOGISCHE STUDIE (N = 136 ; 130 IN CCR)
----- KOMPLEMENTÄR-GRUPPE (N = 497 ; 424 IN CCR)

Abb. 14

THERAPIESTUDIE ALL-BFM 81/83
KRANKHEITSFREIES INTERVALL



Die Ergebnisse ergaben bei einer Wahrscheinlichkeit an krankheits freiem Überleben von 81% der Gesamtstudie ein solches von 94% innerhalb der immunologischen Gruppe bei einem Beobachtungszeitraum von jetzt 18 Monaten. Das krankheitsfreie Intervall beläuft sich in der Gesamtstudie auf eine Wahrscheinlichkeit von 85%, bei den immunologisch typisierten ALL auf 95%. Die hier gefundenen Daten zwischen Gesamtstudie und der immunologischen Studie zeigen kein statistisch signifikantes Unterschiedsverhalten.

In den Abbildungen 15 und 16 ist der Einfluss immunologischen Subtypen auf das krankheitsfreie Überleben wie das krankheitsfreie Intervall dargestellt.

Abb. 15

EINFLUSS DER IMMUNOLOGISCHEN KLASSIFIZIERUNG
KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN

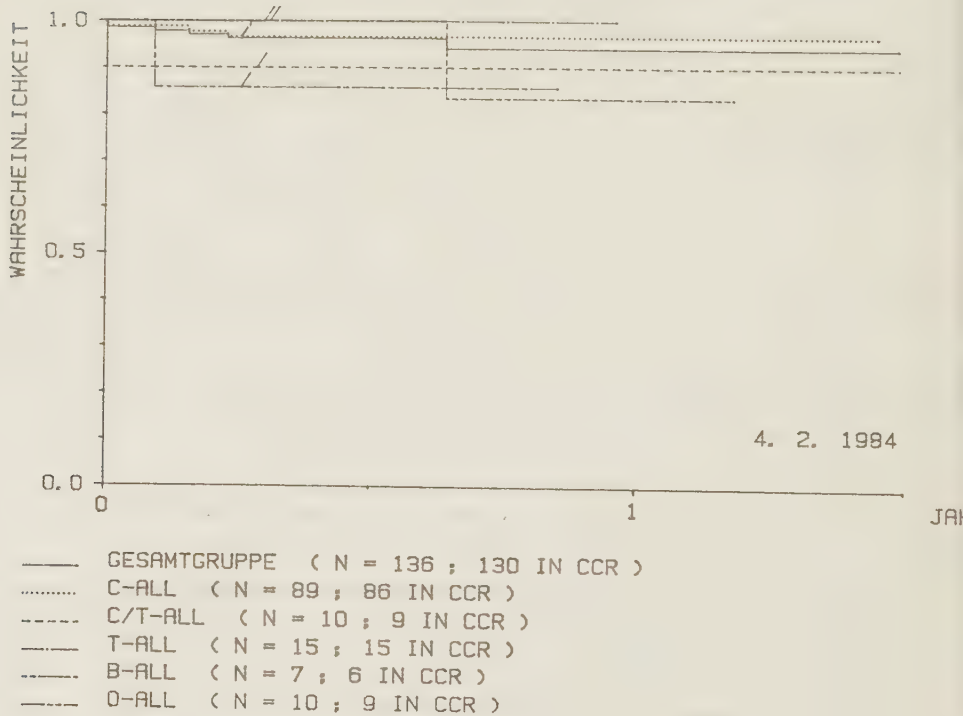
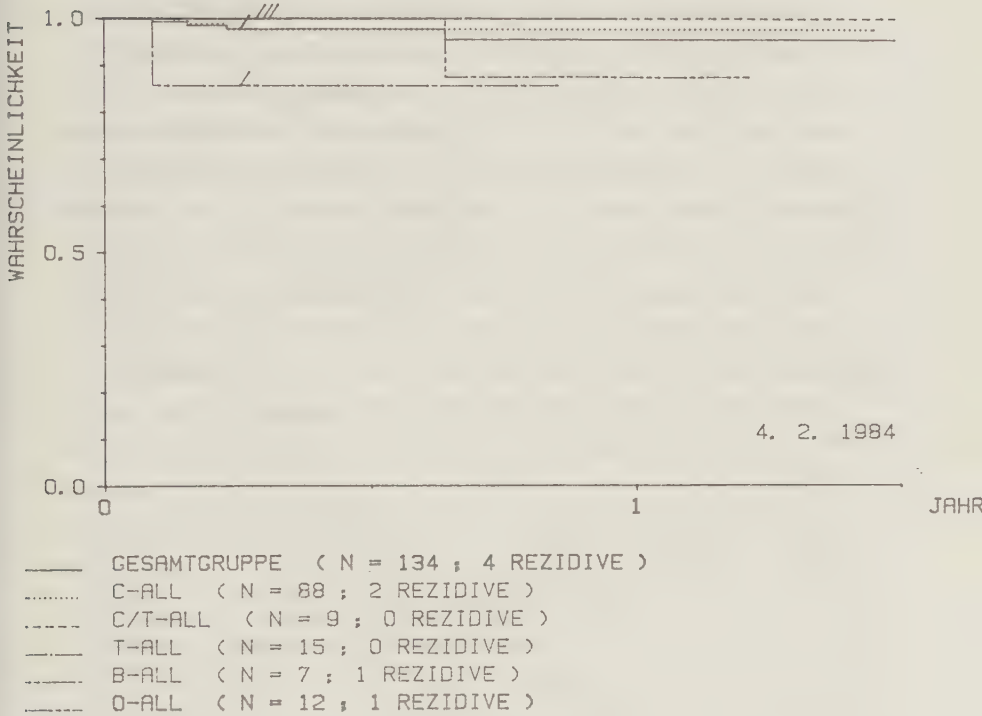


Abb. 16

EINFLUSS DER IMMUNOLOGISCHEN KLASSIFIZIERUNG
KRANKHEITSFREIES INTERVALL



Krankheitsfreies Überleben und krankheitsfreie Intervalle lagen bei der common, der c/T- und der T-ALL Gruppe nahezu in gleichem Maße über dem der B- und O-ALL Gruppe, gleichwohl auch hier derzeit noch kein statistisch signifikant differentes Verhalten erkennbar ist.

IV. DISKUSSION

Leukämien representieren clonale auf einem bestimmten Niveau arre-
tierte Proliferationen, wobei als Target-Zelle des leukämogenen Er-
eignisses jede denkbare Differenzierungsstufe betroffen sein kann.
Im Prinzip imitieren diese Differenzierungsstufen diejenigen der nor-
malen Hämpoese (42, 43). Die immunologische Determinierung einer
umschriebenen hämpoetischen Differenzierungsstufe beruht auf der
Expression eines bestimmten Membranantigenmusters, wie es in spe-
zifischer Weise mit monoclonalen Antiseren ermittelt werden kann.
Es wird somit verständlich, daß Differenzierungsantigene erkennende
monoclonale Antikörper zum einen als Determinanten des normalen
hämpoetischen Differenzierungsweges, anderseits als Klassifikations-
grundlage für hämatologische Systemerkrankungen - insbesondere Leu-
kämien und maligne Lymphome - erfolgversprechend eingesetzt wer-
den können (44, 45). Hierbei stellt die Erkennung von neuexprimierten
Differenzierungsantigenen bzw. ihr Verlust die Klassifizierungsgrund-
lage dar. Alle auf Leukämieblasten identifizierbare Antigene sind auch
auf ihren korrespondierenden normalen Zellen zu finden. Leukämie-
assoziierte oder sogar Leukämiespezifische Antigene sind derzeit
noch unbekannt. Als ein Beispiel hierfür mag erwähnt werden, daß
das common ALL Antigen - zunächst als leukämiespezifisches Antigen
interpretiert (46) - auch auf anderen neoplastischen Zellen wie z.B.
Neuroblastomen (47) exprimiert ist. Zudem finden sich cALLA posi-
tive Blasten im regenerierenden Knochenmark, bzw. sogar auf Kno-
chenmarksstromazellen (48, 49). Vor kurzem konnte cALLA Expression
auch auf Granulozyten nachgewiesen werden (50, 51).

Demzufolge kann die immunologische Klassifizierung lekämischer
Blasten niemals auf der Erkennung eines einzelnen Membranantigens
beruhen, sondern gründet sich vielmehr auf die Erfassung eines um-
fangreichen Spektrums immunologischer Determinanten.

Um beim Beispiel der common ALL zu bleiben, so ist diese durch den

Phänotyp cALLA positiv, Ia positiv, TdT positiv gekennzeichnet. Das cALLA mag wie erwähnt auf einer Reihe anderer neoplastischer oder nicht-neoplastischer Zellen exprimiert sein; auch das mit monomorphen HLA - DR assoziierte Ia - Antigen kommt beispielsweise auf Myeloblasten, Monoblasten, lymphatischen B - Zellen, sowie auch einigen aktivierten T-Zellen vor (52 - 55); TdT Positivität findet sich bei praktisch allen ALL Subtypen mit Ausnahme der B - ALL, auch einigen akuten myeloischen Leukämien (56), wie sogar auch einigen primitiven lymphatischen Zellen im normalen Knochenmark (51, 57) und im normalen Thymus (34), dennoch ist die Kombination der Expression dieser drei Marker (cALLA, Ia, TdT) pathognomonisch für die Erkennung einer common ALL. Dies mag dokumentieren, daß Leukämieblastentypisierung nur mit einem umfangreichen Panel an Antikörper sinnvoll durchführbar ist.

In Zusatzuntersuchungen an Blasten von 47 Patienten mit cALL konnte so unter Verwendung eines noch erweiterteren Panels eine weitere Dissektion dieser Gruppe und somit deren Heterogenität aufgezeigt werden. Alle diese Fälle waren im Bezug auf das Vorkommen intrazytoplasmatischen Immunglobulins vom Schwereketten μ Typ untersucht worden. Eine intrazytoplasmatische μ Expression konnte in 12 der 47 cALL Fällen nachgewiesen werden. Die Blastenpopulationen aller dieser 12 Patienten exprimierten die durch die monoclonalen anti B - Zell Antikörper B1 und BA1 definierten Antigene. Dieser common ALL Subtyp mit Nachweis intrazytoplasmatischer μ Ketten wird als prae B - ALL terminiert (58). In der vorliegenden Studie konnte jedoch gezeigt werden, daß ein Großteil der nicht intrazytoplasmatischen μ Ketten enthaltenden common ALL Fälle ebenfalls durch die Expression von B - Linien assoziierten Antikörpern wie BA1 und B1 gekennzeichnet waren. Dies suggeriert, daß zumindest diese beiden Antikörper noch frühere Stufen der B - Zell Differenzierung zu erfassen vermögen als dies mit dem Nachweis zytoplasmatischen μ

Ketten möglich ist. Es konnte hierbei ein BA1 positiver common ALL Typ von einem simultan BA1 und B1 exprimierenden unterschieden werden. Basierend auf diesen common ALL Typisierungen erscheint dieser Leukämietyp demnach zumindest in vier weitere Subkategorien unterteilbar: den reinen common ALL Typ ohne Expression von B - Markern (cALLA positiv, Ia positiv, TdT positiv), den frühen prae B Phänotyp (cALLA positiv, Ia positiv, TdT positiv, BA1 positiv), den prae prae B Phänotyp (cALLA positiv, Ia positiv, TdT positiv, BA1 positiv, B1 positiv) und den reinen prae B Phänotyp (cALLA positiv, Ia positiv, TdT positiv, BA1 positiv, B1 positiv, zytoplasmatisches μ positiv). Die Übergangsphase zwischen prae B - ALL und reiner B - ALL erscheint ebenfalls durch die Anwendung eines umfangreichen monoclonalen Antikörper Panels näher definierbar. In einem der hier untersuchten Fälle war eine Konstellation BA1 positiv, B1 positiv, Ciga positiv sowie SIg μ und Y29/55 positiv erkennbar. Dieser Phänotyp wird als prae B-B - ALL subsummiert.

Aber auch die T - Linie scheint weitaus heterogener als dies ursprünglich basierend auf heterologen Antikörperuntersuchungen angenommen wurde. Insbesondere die Entwicklung des monoclonalen Antikörpers WT1 (26, 59) oder verwandter Antikörper wie 3A1 (60) oder 4H9 (61) war hier bedeutsam. In etwa 10 von insgesamt 101 cALLA positiven ALL Fällen war das durch diesen Marker definierte Antigen nachweisbar. Diese Phänotypen müssen daher als eine Subentität der common ALL aufgefasst werden, die offenbar Blasten auf dem frühesten T - Differenzierungsniveau entsprechen. Die erste Linie der T - Differenzierung ohne common ALL - Antigen Expression (prae T - ALL) ist neben der WT1 Reaktion durch simultane Präsenz von Lyl2 und OKT 11 charakterisiert, wobei hier in variablem Maße auch die durch OKT 9 und OKT 10 definierten Antigene präsent sind. Zu vermuten ist auch die Existenz einer Zwischenphase, in der common ALL Antigen bereits negativ, WT1 positiv, Lyl2 und OKT 11 jedoch noch

nicht reagibel sind, die dann als frühe prae T - ALL interpretierbar ist. Obgleich im vorliegenden Untersuchungsmaterial derartige Fälle nicht gesehen wurden, sind sie im weiteren Untersuchungsmaterial im hiesigen Labor zu Beobachtung gekommen (Herrmann - persönliche Mitteilung). Die weitaus häufigste aller T - Linien differenzierten akuten lymphoblastischen Leukämien (11/17 Fälle) wiesen das HTA 1 Antigen auf wie es durch den monoclonalen Antikörper OKT 6 erkannt wird. Diese Leukämien entsprechen in aller Regel dem corticalen Thymozyten im neonatalen Thymus (22, 62, 63). In insgesamt 2 Fällen konnten Leukämiephenotypen definiert werden, die der Übergangsphase zwischen prae T - ALL und der dem corticalen Thymozyten - Typ korrespondierten T - ALL Entität entsprechen: WT 1 positiv, Lyt 2 positiv, OKT 6 positiv, OKT 11 negativ. Die dem corticalen Thymozyten - Typen korrespondierende T - ALL Entität ist zudem neben ihrem Hauptmarker OKT 6 durch eine Simultanpräsenz von OKT 4 mit OKT 8 Reagibilität assoziiert (62, 63, 64). Die Segregation in eine ausschließlich OKT 4 positiv OKT 8 negativ und OKT 4 negativ OKT 8 positiv Zellen erfolgt innerhalb der normalen T - Zell Ontogenese in der Transformationsphase vom corticalen zum medullären Zelltypen. Ein solcher medullärer Zelltyp fand sich im hier vorliegenden Untersuchungsgut in 3 Fällen. In einem einzigen Fall fanden sich Blasten mit Expression des cALLA und gleichzeitigem OKT 6 Nachweis. Eine solche Variante mag entweder einer umschriebenen Phase der normalen T - Zell Differenzierung oder einer Subpopulation corticaler Thymozyten entsprechen (65, 66). Eine denkbare Möglichkeit für Erklärung eines solchen Phänotypen wäre auch die Annahme, daß die cALL Antigen Glycoproteindeterminante ähnlichen Determinanten entsprechen könnte, die unter anderem auch einer solchen umschriebenen Stufe der T - Zell Ausreifung exprimiert werden könnten (67).

In der Tabelle 22 ist synoptisch eine auf diesen Kriterien basierende erweiterte immunologische ALL - Subtypisierung vorgeschlagen.

Tab. 22

Erweiterte immunologische Subtypenklassifikation der akuten nicht myeloischen Leukämien

	(Ia) POX neg.
AUL	Ia, TdT
O - ALL	Ia, TdT, cALLA
common ALL	Ia, TdT, cALLA, BA1
frühe prae B - ALL	Ia, TdT, cALLA, BA1, B1
prae prae B - ALL	Ia, TdT, cALLA, BA1, B1, Clg
prae B - ALL	Ia, BA1, B1, Clg, Sig, Y 29/55
prae B - B - ALL	Ia, BA1, B1, Sig, Y 29/55, (B 2)
B - ALL	Ia, TdT, cALLA, WT 1
frühe prae T - ALL (c/T)	TdT, WT 1
prae prae T - ALL	TdT, WT 1, Lyt 2, OKT 11
prae T - ALL	TdT, WT 1, Lyt 2, OKT 11, OKT 6
T - ALL (cortical)	(TdT), WT 1, Lyt 2, OKT 11, OKT 3, OKT 4/8
T - ALL (medullär)	

Neben den beschriebenen Membran- oder intrazytoplasmatischen Markern sind auch nukleäre Marker von diagnostischer Bedeutung. So findet sich beispielsweise die terminale Desoxynucleotidyl - Transferase, ein Enzym welches die Polymerisation von Desoxyribonucleotiden am 3-OH Ende von Polydesoxyribonucleotiden katalysiert, auf allen cALL inclusive ihrer frühen B - Varianten, allen T - ALLs, sowie den O - ALLs. Diese O - ALL - also die non - common, non - T -, non - B - ALL - wird von der sogenannten akuten immunologisch unklassifizierbaren Leukämie durch den TdT Nachweis abgegrenzt (68). Diese beiden Subtypen, O - ALL und AUL weisen keine zytochemischen oder morphologischen Merkmale einer Zugehörigkeit zur myeloischen Linie auf und sind im Falle der O - ALL ausschließlich Ia und TdT positiv, im Falle der AUL lediglich fakultativ Ia positiv. Die Entwicklung neuerer myeloischen Antisera, die myeloische Zellen bis hin zum CFU - c Stadium markieren, ließ zumindest in einem der beiden Fälle - obgleich POX negativ - immunologisch eine myeloische Differenzierung vermuten. An dieser Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, daß im pädiatrischen Untersuchungsgut der Anteil dieser O - ALL oder AUL Typen im Vergleich zum internistischen Krankengut deutlich geringer ist. In einer aktuellen BFMT - Studie der internistischen ALL belief sich z.B. der Anteil dieser Fälle auf 26% (69).

In Übereinstimmung mit anderen Studien (70-75) konnte auch hier gezeigt werden, daß immunologisch definierte Subgruppen der ALL mit einheitlichen klinischen Merkmalen korrelieren. Die immunologische Blastentypisierung ist somit also offenbar in der Lage, Leukämien mit unterschiedlichem biologischen Verhalten zu diskriminieren. In dem vorliegenden Material konnten so gewisse Merkmale wie relativ niedrige periphere Blastenzahl, niedrige Hämoglobin- und Thrombozytenwerte mit der common ALL assoziiert werden. Zudem fanden sich bei diesem Subtyp nur geringe Organmanifestationen als möglichen Hinweis, daß hier offenbar das Knochenmark das Biotop für die Leukämoide Entartung darstellt.

T - differenzierte ALL Typen hingegen wiesen eine wesentlich größere Tumormasse als die cALL Subgruppen auf. Die Hämoglobin- und peripheren Thrombozytenwerte zeigten bei diesen Leukämiegruppen eine wesentlich geringere Erniedrigung. Dies mag eine spätere Ansiedlung der Blasten im Knochenmark vermuten lassen und suggeriert, daß hier eine primär vom Thymus ausgehende Leukämie vorzuliegen scheint. Bei der T- sowie aber auch bei der O - ALL Gruppe fand sich ein auffallend häufiger Lymphknotenbefall (bei 60% der T- und O - ALL Fälle verglichen mit 32% bei der cALL Gruppe), wobei Leber- und Milzvergrößerungen bei der O - ALL mit denen der cALL vergleichbar aber bei der T - ALL jedoch statistisch deutlich signifikant größere Ausmaße erreichten. Entsprechend war der Risikofaktor bei der T - ALL, da diese in der Regel mit hoher peripherer Blastenzahl und massiven Hepato- und insbesondere Splenomegalien einhergingen, größer als dies für die O - ALL und mehr noch für die cALL zutraf. Naturgemäß waren entsprechend die Risikofaktorwerte bei der B - ALL besonders niedrig (in aller Regel nur geringe Blastenzahl und nur geringe Tumorausbreitung in Leber und Milz). In Kenntnis des besonders aggressiven Verhaltens dieser Entität jedoch war in der

Studie die Therapie bei diesem Subtyp vom Risikofaktor unabhängig und einem eigenen B - Therapiearm unterworfen. Eine Erklärung für die Aggressivität der B - ALL Gruppe trotz ihrer relativ kleineren Tumorzellmasse im Vergleich mit anderen ALL Subgruppen mag wohl in einer höheren Frequenz an therapierefraktären Mutanten zu suchen sein (76).

Auch in anderen Studien wurde mehrfach dokumentiert, daß bestimmte klinische Parameter mit der Prognose akuter Leukämien korrelieren. So wurden als Risikoparameter hohe periphere Leukozytenwerte (77-80), männliches Geschlecht (81, 82), höheres Lebensalter (83-85), niedrige periphere initiale Thrombozytenwerte (86), niedrige initiale Hämoglobinwerte (87), mediastinale Masse (87-89), Hepatomegalie (90) wie

auch Splenomegalie (90), bestimmtes zytochemisches Verhalten (91, 92), initialer ZNS - Befall (13, 77) sowie 1.2 Morphologie (93-95) interpretiert.

Als Prüfstein jedweder Leukämieklassifikation muß gelten, ob hiermit diagnostische Subentitäten zu bestimmten klinischen Erscheinungsbilder korrelieren und ob sie prognostische Bedeutung aufweisen. Nur so kann eine Leukämieklassifizierung ein Glied zwischen biologischem Tumorverhalten und entsprechend unterschiedlichen therapeutischen Erfordernissen darstellen. Wie es die Ergebnisse der vorliegenden Studie klar demonstrieren, entspricht die immunologische Klassifikation solchen Erfordernissen. Fast alle immunologisch definierbaren Subtypen waren mit klinischen und morphologischen Parameter statistisch signifikant korrelierbar. In einigen kleineren Gruppen zeigte sich, wenn auch noch keine Signifikanzen erkennbar, doch ein deutlicher Trend. Die Gruppe der T - ALL war so z.B. als eine Subgruppe definierbar, die in einem höheren Lebensalter vorkommt, das männliche Geschlecht bevorzugt, mit einer hohen initialen Blastenzahl assoziiert war, mit Organomegalien, mediastinaler Masse und häufigem initialen ZNS - Befall einherging und somit auch einen hohen Risikofaktor implizierte. Auch die O - ALL war mit höherem Lebensalter, höheren peripheren Leukozyten- und Blastenwerten, Lymphknotenvergrößerungen assoziiert. Auch hier ist somit folglich eine gute Korrelation zum Risikofaktor gegeben. In der überwiegenden Literatur (96-100) werden die liniendifferenzierten, also die T - oder B - ALL als die Leukämieformen mit den schlechtesten Prognosen dargestellt. Andere Autoren assoziieren aber auch die O - ALL mit einem größeren prognostischen Risiko. Als prognostische Rangordnung wurde die O - ALL zwischen die common ALL und die T - ALL plaziert (cALL O - ALL T - ALL B - ALL) (74, 101).

Eine Erklärung dafür, weshalb immunologische Phänotypen prognose-

assoziiert sind mag in den programmierungs- oder differenzierungsbedingten Eigenschaften der entsprechenden in die Krankheit involvierten Zelltypen liegen. Die hierfür möglicherweise einfachste Erklärung mag darin begründet liegen, daß kinetische Eigenschaften, die lymphatischen Vorläuferzellen auf verschiedenen Differenzierungsstadien anhaften bereits die primäre Determinante der klinischen Ansprechbarkeit beinhalten. Kombinierte immunologische und zellzyklusanalytische Untersuchungen durch Durchflußzytometrie zeigten, daß verschiedene ALL Subtypen durchaus verschiedene Wachstumsfraktionen z.B. Anteile an sich in S-Phasen und G₀-Phasen befindliche Zellen beinhalten (76). Ähnliche Beobachtungen waren bereits früher durch Inkorporationsmessungen von radioaktivem Thymidin sowie auch durch autoradiographische Methoden mitgeteilt worden. Es ist daher anzunehmen, daß die rascher wachsenden B-ALL und T-ALL Subtypen mit den gemeinhin Zellzyklusphasen abhängigen zytostatischen Substanzen eine bessere therapeutische Ansprechbarkeit zeigen. In der Tat, es ist bekannt, daß bei den T-ALLs der rascheste Remissionseintritt zu verzeichnen ist (76, 102). Andererseits birgt eine rasch wachsende Zellfraktion jedoch auch andere Risiken wie ein vermehrtes Vorkommen medikamentenresistenter Mutanten in sich.

Natürlich bleibt zu berücksichtigen, daß der immunologische Phänotyp kein unabhängiges prognostisches Korrelat darstellt; er ist jedoch zu anderen differenzierungsgebundenen Merkmalen, insbesondere Wachstumsrate und Ort der clonalen Expansion (z.B. Knochenmark versus Thymus) assoziiert, die kritisch die Größe der clonogenen leukämischen Population und den hiermit assoziierten Status im Hinblick auf die medikamentenresistenten Mutanten zur Zeit der Diagnose und Therapieanwendung beeinflussen.

Es war auch Ziel der vorliegenden Arbeit immunologisch definierte ALL Subtypen bezüglich ihrer prognostischer Relevanz zu evaluieren. Die Remissionsrate betreffend ließen sich keine Unterschiede ermitteln,

alle Patienten, die keine protokollwidrige Therapie erhalten hatten - mit Ausnahme eines Patienten, der in der Initialphase der Behandlung verstarb - die Remission erreicht hatten. Von den 136 Patienten, die weiter evaluiert wurden, rezidierten im Beobachtungszeitraum lediglich 4 Kinder, worunter 1 B-ALL, 1 O-ALL und 2 cALL zu registrieren waren. Die maximale Beobachtungszeit beträgt inzwischen 18 Monate. Im Gegensatz zur Literatur ließ sich in der vorliegenden Studie kein Anlass für eine Assoziation der T-ALL Subgruppe mit einer schlechteren Prognose finden. Auch waren prognostische Unterschiede weder zwischen der cALL und der O-ALL noch verglichen mit der B-ALL statistisch signifikant. Es gilt hierbei jedoch zu berücksichtigen, daß die Beobachtungszeit in der vorliegenden Studie sicher noch zu kurz, und die Fallzahl in einigen Subgruppen zu gering ist. Ferner muß berücksichtigt werden, daß die in der BFM - Studie verwendete risikoadaptierte und somit indirekt dem biologischen Verhalten - also auch dem immunologischen Subtypen - rechnungstragende Therapie eine so hohe Kurabilität ermöglicht, daß prognostische Unterschiede sehr gering geworden sind. Dies suggeriert, daß die Therapiemodalitäten und insbesondere die Initialtherapie Risikomerkmale zum großen Teil auszugleichen vermögen. Die Einleitung der Therapiestrategie innerhalb der BFM - Studie in vier Hauptgruppen (Gruppe mit niedrigem Risikofaktor, Gruppe mit mittlerem Risikofaktor, Gruppe mit hohem Risikofaktor und B-ALL Gruppe) scheint bereits die Gruppen zu erfassen, die auch immunologisch definiert Merkmale des erhöhten Risikos aufweisen. Unter diesem Aspekt ist auch der Befund von Græves et al. (13) zu interpretieren, daß wenn man common ALL Fälle mit gleicher initialen Leukozytenzahl wie T-ALL Fälle korreliert sich hier prognostische Unterschiede auch bei einer nichtrisikoadaptierten Therapieform nivellieren lassen.

Längere Beobachtungszeiträume und eine weitere systematische immunologische Blastentypisierung bei neudiagnostizierten Patienten werden sicher dazu beitragen diese Annahmen weiter überprüfen zu

können. Dennoch kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt aus den vorliegenden Daten abgeleitet werden, daß die immunologische Blastentypisierung insbesondere bei Verwendung monoclonaler Antiseren eine unumstrittene diagnostische Erweiterung darstellt. Die Möglichkeiten, die diese Methoden beinhalten mögen derzeit noch erweiterungsfähig sein und eine gewisse Zukunftsperspektive erwarten lassen. Die weitere Dissektion wie dies hier am Beispiel der cALL und T-ALL-Heterogenität aufgezeigt wurde, mag, wenn solche Subtypisierung einer Multiparameteranalyse unterzogen wird, durchaus weitere Aufschlüsse und prognostische Valenzen beinhalten.

Ein klinisch wichtiger Faktor innerhalb der Leukämiediagnostik mag auch die frühe Rezidiverkennung darstellen. Auch hier eröffnet sich ein Einsatzfeld für die immunologische Diagnostik. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand erscheint dies immunologisch mit hinreichender Sicherheit nur im Falle des Rezidivs des T-ALL Subtyps welcher dem corticalen Thymozytentyp entspricht gewährleistet (22), da im nichtleukämischen Mark das hier diagnostisch wichtige HTA 1 Antigen, definiert durch den monoclonalen Antikörper OKT 6, nicht vorkommt. Im Falle der common ALL ist dies derzeit nicht ausreichend belegbar, da eine cALLA oder auch TdT Expression auch im posttherapeutisch regenerierenden Mark erkennbar sein kann. Es ist zudem bekannt, daß bei Leukämie rezidiven phänotypische Shifts vorkommen können, die im Vergleich zum Phänotypen bei der Primärdiagnose als unreifere oder auch reifere Leukämievarianten in Erscheinung treten können (103, 104). Hier wäre sicher von Interesse, einen Zusammenhang dieser Shifts und der schlechteren therapeutischen Ansprechbarkeit der Rezidivblasten genauer zu dokumentieren.

Durch bestimmte therapeutische Manipulationen induzierte Differenzierungen sind in ihrer Initialphase durch entsprechende Musterveränderungen der Membranantigenenprofile vermutlich leichter erkennbar

als dies morphologisch möglich ist. Auch hier könnte ein Ansatzpunkt für die immunologische Zelltypisierung sein. In vitro Versuche zeigten nämlich, daß Blasten unter Einwirkung bestimmter Substanzen, wie beispielsweise Phorbol ester oder DMSO maligne Zellen zur Differenzierung bringen könnten (105). Dieses Phänomen ist im Falle sogenannter "smouldering" Leukämien mit niedrigdosierten differenzierungsinduzierten Cytosin-Arabinosid und Anthrazyklinderivaten therapeutisch genutzt (106).

Monoklonale Antikörper könnten auch als direkte Therapeutika oder als Vermittler gekoppelt an zytostatische oder andere toxische Substanzen wie Razine vom therapeutischen Nutzen sein, wie dies bereits tierexperimentell (107) oder auch humanklinisch am Beispiel einiger T - Leukämien (108) belegt, dokumentiert wurde.

Ein weiteres derzeitiges Anwendungsgebiet erscheint die Klärung autologer Transplantate durch monoklonale Antikörper (109) wie anti cALLA im Falle der common ALL (110) oder mit späten anti B Reagenzien im Falle leukämischer B - Zell Neoplasien (111).

Auch die Möglichkeit des Einsatzes der Hybridoma - Technologie zur Gewinnung anti idiotypischer Antikörper stellt eine wesentliche Erweiterung der denkbaren therapeutischen Möglichkeiten bei Leukämien dar (112).

Neben der Möglichkeit der Subtypisierung der lymphatischen Leukämien hat sich das Feld der monoklonalen Antikörperdiagnostik inzwischen auch auf das Gebiet der Phänotypisierung myeloischer Neoplasien erstreckt (113-115). Zwar besteht derzeit weitgehend Unklarheit bezüglich des leukämogenen Targetings myeloischer Neoplasien, dennoch mag das "commitment" im Rahmen der Myelopoese mit dem Differenzierungsverhalten der Lymphopoese vergleichbar sein. Es erscheint hier zwar noch nicht gesichert ob die maligne Entartung einer myeloischen Zelle (wenn wir das Konzept der clonalen Herkunft der

AML anerkennen) auf der Stufe einer pluripotenten Stammzelle oder vielleicht der Stufe einer Postdeterminierungsphase - wahrscheinlich einer CFU-c - vorkommt. Es ist jedoch zu vermuten, daß weitere immunologische Untersuchungen unter Verwendung monoclonaler Antikörper zu einer Definierung von Antigenen auf fröheterminierten myeloischen Zellen - so wie es bei den Differenzierungsantigenen der Lymphopoese der Fall ist - führen.

Neuere Untersuchungen über das Phänomen der sogenannten "lineage-infidelity" (116) versprechen weitere Hinweise auf das Verständnis der frühen leukämischen Blastendeterminierung. Unter diesem Begriff ist die simultane Expression von mit monoclonalen Antikörpern erfassbaren Antigenen zu verstehen, die für mehr als einen Differenzierungsweg charakteristisch sind. Dieses Phänomen suggeriert, daß die Differenzierungsprogramme von Blasten nicht nur solchen Veränderungen unterliegen, die zur Arretierung der leukämogen betroffenen Zelle auf einem bestimmten Differenzierungsniveau führt, sondern vielmehr, daß Differenzierungsprogramme grundsätzlich in leukämischen Zellen abnorm konstituiert sind und aus mehreren programmatischen Komponenten der normalen Differenzierungslinien bestehen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die ALL im Kindesalter - die häufigste pädiatrische Neoplasie - erscheint zunehmend eine heilbare Erkrankung zu sein. Voraussetzung hierfür ist jedoch u. a. eine präzise Erfassung von Risikogruppen mit der Implikation einer risikoangepaßten Therapie.

In der vorliegenden Studie wurden Leukämieproben von 140 Kinder einer immunologischen Blastentypisierung unterzogen. Ziel war hierbei eine verbesserte Leukämieklassifikation und ihre Korrelation mit unterschiedlichen Verlaufs- und Prognosegruppen.

Das Patientengut entstammte der ALL Therapiestudie BFM 81/83. Die Blastenphänotypisierung erfolgte im immunologischen Labor der Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Klinikum Steglitz der FUB. Sie wurde mit einem umfangreichen Panel von konventionellen immunologischen Markern sowie monoclonalen Antikörper durchgeführt. Die immunologischen Daten wurden mit klinischen Parametern wie Alters- und Geschlechtsverteilung morphologischen und zytochemischen Merkmalen, zellvolumetrischen Daten, initialen hämatologischen Laborbefunden, Organmanifestationen und einem errechneten Risikofaktor korreliert. Die Verwendung des umfangreichen Panels der Immunmarker ermöglichte die Unterteilung der ALL im pädiatrischen Patientengut in insgesamt 8 Subgruppen: common ALL (90 Fälle), common/T-ALL (10 Fälle), prae T-ALL (3 Fälle), T-ALL (17 Fälle), prae B-B-ALL (1 Fall), B-ALL (7 Fälle), O-ALL (10 Fälle) und AUL (akute immunologisch unklassifizierbare Leukämie) (2 Fälle). Ergänzende Untersuchungen etablierten noch eine weitere Heterogenität der cALL und der T-ALL Subgruppe. Eine erweiterte, den derzeitigen Erkenntnisstand berücksichtigende Klassifikation der ALL konnte somit vorgeschlagen werden.

Es ergab sich, daß die immunologisch ermittelten ALL Subgruppen mit einem einheitlichen klinischen Muster korrelieren und somit auch

einen einheitlichen Verlaufs- und Prognosetyp darstellen. Aufgrund der hohen Remissionsrate wie sie in der BFM - Studie durch risiko-adaptierte aggressive Initialtherapie erzielt wurde konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied der verschiedenen immunologischen Subtypen im Hinblick auf ihre Therapieansprechbarkeit ermittelt werden. Auch die Life - Table Analyse zeigte keine prognostisch signifikanten Unterschiede innerhalb der Subtypen, gleichwohl die B - wie auch die O - ALL eine geringere Wahrscheinlichkeit an krankheitsfreiem Überleben und krankheitsfreiem Intervall verglichen mit der common ALL aufwiesen. Bei der noch kurzen maximalen Beobachtungszeit von 18 Monaten mögen hier die Daten noch nicht endgültig interpretierbar sein.

VI. LITERATUR

1. Henze, G., Die akute lymphoblastische Leukämie, in: B. Kornhuber Red., Pädiatrie: Weiter- und Fortbildung. Onkologie im Kindesalter. Springer Verlag, 1984
2. Farber, S., Diamond, L.K., Mercer, R.D., Sylvester, R.F., Wolff, J.A., Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (Aminopterin), N.Engl.J. Med., 238, 787-791, 1948
3. Riehm, H., Langermann, H.-J., Gadner, H., Odenwald, E., Henze, G., The Berlin Childhood ALL Therapy Study 1970-1976, Am.J. Ped. Oncol/Hematol., 2, 299-306, 1980
4. Riehm, H., Gadner, H., Welte K., Die West-Berliner Studie zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie des Kindes - Erfahrungsbericht nach 6 Jahren, Klin. Pädiat., 189, 89-102, 1977
5. Henze, G., Langermann, H.-J., Brämswig, J., Bren, H., Gadner, H., Schellong, G., Welte, K., Riehm, H., Ergebnisse der Studie BFM 76/79 zur Behandlung der akuten lymphoblastischer Leukämie bei Kindern und Jugendlichen, Klin. Pädiat. 193, 145-154, 1981
6. Henze, G., Langermann, H.-J., Fengler, R., Brandeis, M., Evers K.G., Gadner, H., Hinderfeld, L., Jobke, A., Kornhuber, B., Lampert, F., Lasson, U., Ludwig, R., Müller-Wehrich, S., Neidhardt, M., Nessler, G., Niethammer, D., Rister, M., Ritter, J., Schaaff, A., Schellong, G., Stollmann, B., Treuner, J., Wahlen, W., Weinelt, P., Wehinger, H., Riehm, H., Therapiestudie BFM 79/81 zur Behandlung der ALL bei Kindern und Jugendlichen: intensivierte Reinduktionstherapie für Patientengruppen mit unterschiedlichem Rezidivrisiko. Klin. Pädiat. 194, 195-203, 1982
7. Riehm, H., Gadner, H., Henze, G., Kornhuber, B., Langermann H.-J., Müller-Wehrich, S. & Schellong, G., ALL: Treatment

- results in three BFM Studies (1970-1981). in: S.B. Murphy and J.R. Gilbert eds., *Leukemia Research: Advances in Cell Biology and Treatment*, Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1983
8. Köhler, G., Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497, 1975
9. Riehm, H., Henze, G., Langermann H.-J., Odenwald, E., Müller-Weihrich, S., Childhood B-type non-Hodgkin lymphoma: improved prognosis in two consecutive BFM Studies. *Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy*, Wien, 28.08-02.09.1983
10. Müller-Weihrich, S., Wündisch, G.F., Henze, G. und Riehm, H., Manifestationsvarianten, Therapie und Prognose des Non-Hodgkin Lymphoms vom B-Typ im Kindesalter. *Tagung der Süddeutschen Kinderärzte*, Bayreuth, 25-26.06.1983
11. Brouet, J.-C., Valensi, F., Daniel, M.-T., Flandrin, G., Preud'homme J.-L., and Seligmann, M., Immunological classification of acute lymphoblastic leukaemia: Evaluation of its clinical significance in a hundred patients. *Br. J. Haematol.*, 33. 319-328. 1976
12. Janossy, G., Hoffbrand, A.V., Greaves, M.F., Ganeshaguru, K., Pain, C., Bradstock, K.F., Prentice, H.G., Kay, H.E.M., and Lister, T.A., Terminal Transferase Enzyme Assay and immunological membrane markers in the diagnosis of leukaemia: a multi-parameter analysis of 300 cases. *Br. J. Haematol.* 44. 221 - 234, 1980.
13. Greaves, M.F., Janossy, G., Peto, J., and Kay, H., Immunologically defined subclasses of acute lymphoblastic leukaemia in children: their relationship to presentation features and prognosis. *Br. J. Haematol.* 48. 179-197, 1981.
14. Haas, R.J., Netzel, B., Janka, G.E., Rodt, H., Thiel, E. und Thierfelder, S., Diagnostischer Einsatz spezifischer Antiseren

- bei der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter. *Klin. Pädiat.* 191. 446-452, 1978.
15. Böyum, A., Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21.(suppl. 97), 51-76, 1968.
 16. Herrmann, F. and Wirthmüller, R., Cell surface phenotyping in patients with leukemic non-Hodgkin lymphomas (NHL) of low and intermediate malignancy. *Immunobiol.* 163. 77-94, 1982.
 17. Herrmann, F., Kolecki, P., Sieber, G., Ludwig W.-D., Komischke, B., Rühl, H., Chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes forming SRBC rosettes not due to an anti - SRBC activity of monoclonal surface immunoglobulin. *Am. J. Clin. Pathol.*, im Druck.
 18. Knapp, W., Majdic, O., Bettelheim, P. and Litzka, K., VIL - A1 a monoclonal antibody reactive with common acute lymphatic leukemia cells. *Leuk. Res.* 6. 137-147. 1982.
 19. Lampson, L.A., Levy, R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.* 125. 293-299. 1980.
 20. Goding, J.W., Burns, G.F. Monoclonal antibody OKT 9 recognizes the receptor for transferrin on human acute lymphocytic leukemia cells. *J. Immunol.* 127. 1256-1258. 1981.
 21. Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science, New York.* 206. 347-349. 1979.
 22. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Levey, R.H., and Schlossman, S.F. Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T cell lineage. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 77. 1588-1592. 1980.
 23. Verbi, W., Greaves, M.F., Schneider C., Monoclonal antibodies OKT 11 and OKT 11A have pan T reactivity and block sheep erythrocyte "receptors". *Eur. J. Immunol.* 12. 81-86. 1982.

24. Kamoun, M., Kadin, M.E., Martin, P.J., Nettleton, J., Hansen, J.A. A novel human T-cell antigen preferentially expressed on mature T cells and shared by both well and poorly differentiated B-cell leukemias and lymphomas. *J. Immunol.* 127. 987 - 991. 1981.
25. Herrmann, F., Lochner, A., Enders, B., Komischke, B., Rühl, H. Dual expression of T and B cell markers in human B cell neoplasias. *Acta Haemat.* 69. 319-325. 1983.
26. Tax, W.J.M., Tidman, N., Janossy, G., Trejdosiewicz, L., Riki Willems, Jet Leuwenberg, de Witte, T.J.M., Capel, P.J.A. and Koene, R.A.P. Monoclonal antibody (WT 1) directed against a T cell surface glycoprotein: characteristics in immunosuppressive activity. *Clin. Exp. Immunol.* 55. 427-436. 1984.
27. Nadler, L.M., Stashenko, P., Hardy, R., Agthoven, A., Terhorst, C., Schlossman, S.F. Characterization of a human B cell specific antigen (B 2) distinct from B 1. *J. Immunol.* 126. 1941-1947. 1981.
28. Abramson, C.S., Kersey, J.H., LeBien, T.W., A monoclonal antibody (BA 1) reactive with cells of human B lymphocyte lineage. *J. Immunol.* 126. 83-88. 1981.
29. Kersey, J.H., LeBien, T.W., Abramson, C.S., Newman, R., Sutherland, R., and Greaves, M., p24: a human leukemia - associated and lymphohemopoietic progenitor cell surface structure identified with monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 153. 726-731. 1981.
30. Forster, H.K., Gudat, F.G., Girard, M.F., Albrecht, R., Schmidt, J., Ludwig, C., Obrecht, J.P. Monoclonal antibody against a membrane antigen characterizing leukemic human B lymphocytes. *Cancer Res.* 42, 1927-1934. 1982.
31. Breard, J., Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Schloss-

- man, S.F. A monoclonal antibody reactive with human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 124. 1943-1948, 1980.
32. Knapp, W., Majdic, O., Rumpold, H., Bettelheim, P., Kraft, D., Liszka, K., Förster, O., and Lutz, D. Myeloid differentiation antigens as defined by monoclonal antibodies. in: W. Knapp ed., *Leukemia Markers*, Academic Press, 1981.
33. Herrmann, F., Sieber, G., Komischke, B., Schreckenber, A., Ludwig, W.-D., and Rühl, H. Expanded T-gamma cell populations with the morphology of large granular lymphocytes. I. Immunological, clinical and morphological characterization. *Leuk. Res.* 7. 667-680. 1983.
34. Bollum, F.J. Antibody to terminal deoxynucleotidyl transferase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72. 4119-4122. 1975.
35. Bennet, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.-T., Flandrin, G., Gálton D.A.G., Gralnick, H.R., and Sultan, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. *Br. J. Haematol.* 33. 451-458. 1976.
36. Barka, T., Anderson, P.J. *Histochemistry. Theory, Practice and Bibliography.* New York. Harper and Row. 1965.
37. Thom, R. Method and results by improved electronic blood cell sizing. in: *Modern concepts in haematology.* New York, London, Academic Press. 1972.
38. Cutler, S., Ederer, F. Maximum utilization of the life - table method in analysing survival. *J. Chron. Dis.* 4. 699-712. 1958.
39. Wilcoxon, F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bull.* 1. 80-83. 1945.
40. Armitage, P. *Statistical methods in medical research.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1971.

41. Müller, P.H., Neumann, P., Storm, R., Tafeln der mathematischen Statistik. Fachbuchverlag. Leipzig. 1973.
42. Nadler, L.M., Ritz, J., Reinherz, E.L., and Schlossman, S.F. Cellular origins of human leukemias and lymphomas. in: W. Knapp ed., Leukemia Markers, London, Academic Press, 1981.
43. Aisenberg, A.C. Cell lineage in lymphoproliferative diseases. Am. J. Med. 74. 649-685. 1983.
44. Greaves, M.F. Monoclonal antibodies as probes for leukaemic heterogeneity and haemopoietic differentiation. in: W. Knapp, ed. Leukemia Markers, London, Academic Press, 1981.
45. Ritz, J., Pesando, J.M., Notis-McConarty J., Clavell, L.A., Sallan, S.E., and Schlossman, S.F. Use of monoclonal antibodies as diagnostic and therapeutic reagents in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res. 41. 4771-4775. 1981.
46. Kabisch, H., Arndt, R., Becker, W.-M., Gaedicke, G., Winkler, K., Thiele, H.-G., Landbeck, G. Common ALL assoziiertes Antigen auf Zellen und im Serum von common ALL Patienten: klinische Relevanz und biochemische Charakterisierung. Klin. Pädiat. 191. 182-188. 1979.
47. LeBien, T., Kersey, J., Nakazawa, S., Minato, K., and Minowada, J. Analysis of human leukemia/lymphoma cell lines with monoclonal antibodies BA 1, BA 2 and BA 3. Leuk. Res. 6. 299 - 305. 1982.
48. Janossy, G., Bollum, F.J., Bradstock, K.F., and Ashley, J., Cellular phenotypes of normal and leukemic hemopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations. Blood. 56. 430-441. 1980.
49. Newman, R.A., Sutherland, R. and Greaves, M.F. The biochemical characterization of a cell surface antigen associated with

- ALL and lymphocyte precursors. *J. Immunol.* 126. 2024-2030. 1981.
50. Bernard, A., Boumsell, L., Dausset, J., Milstein, C., Schlossman, S.F., eds. Monoclonal antibody (J5) to the common ALL reacts with normal human polymorphonuclear neutrophils. Cossman, J. and Neckers, L. in: Human leukocyte markers detected by monoclonal antibodies. Springer. Im Druck.
 51. Greaves, M.F., Hariri, G., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Ritter, M.A., and Ritz, J. Selective expression of the common ALL (gp 100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood.* 61. 628-639. 1983.
 52. Schlossman, S.F., Chess, L., Humphreys, R.E., and Strominger, J.L. Distribution of Ia-like molecules on the surface of normal and leukemic human cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73. 1288-1292. 1976.
 53. Giphart, M.J., Kaufman, J.F., Fuks, A., Albrechtsen, D., Solheim, B.G., Bruning, J.W., and Strominger, J.L. HLA - D associated alloantisera react with molecules similar to Ia antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74. 3533-3536. 1977.
 54. Brodsky, F.M., Parham, P., Barnstable, C.J., Crumpton, M.J., and Bodmer, W.F. Hybrid myeloma antibodies against MHC products. *Immunol. Rev.* 47. 3-11. 1979.
 55. Greaves, M.F., Verbi, W., Festenstein, H., Papasteriadis, C., Jaraquemada, D., and Hayward, A. Ia-like antigens on human T cells. *Eur. J. Immunol.* 9. 356-362. 1979.
 56. Jani, P., Verbi, W., Greaves, M.F., Bevan, D., and Bollum, F., Terminal deoxynucleotidyl transferase in acute myeloid leukaemia. *Leuk. Res.* 7. 17-29. 1983.
 57. Janossy, G., Bollum, F.J., Bradstock, K.F., McMichael, A.,

- Rapson, N., and Greaves, M.F. T-receptor transferase positive human bone marrow cells exhibit the antigenic phenotype of common acute lymphoblastic leukemia. *J. Immunol.* 123. 1525-1529. 1979.
58. Vogler, L.B., Crist, W.M., Bockman, D.E., Pearl, E.R., Lawton, A.R. and Cooper, M.D. Pre-B-cell leukemia. A new phenotype of childhood lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 294. 245-248. 1976.
59. Vodinelić, L., Tax, W., Bai, Y., Pegram, S., Capel, P., and Greaves, M.F. A monoclonal antibody (WT 1) for detecting leukemias of T-cell precursors (T-ALL). *Blood.* 62. 1108-1113. 1983.
60. Haynes, B.F., Eisenbarth, G.S., and Fauci, A.S. Human lymphocyte antigens: Production of a monoclonal antibody that defines functional thymus-derived lymphocyte subsets. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76. 5829-5833. 1979.
61. Link, M., Warnke, R., Finlay, J., Amylon, M., Miller, R., Dilley J., and Levy, R. A single monoclonal antibody identifies T-cell lineage of childhood lymphoid malignancies. *Blood.* 62. 722-728. 1983.
62. Boumsell, L., and Bernard, A. Surface antigens on human malignant T-cells. in: W. Knapp, ed., *Leukemia Markers*, London, Academic Press, 1981.
63. Reinherz, E.L., and Schlossman, S.F. Derivation of human T-cell leukemias. *Cancer Res.* 41. 4767-4770. 1981.
64. Roper, M., Crist, W.M., Metzgar, R., Ragab, A.H., Smith, S., Starling, K., Pullen, J., Leventhal, B., Bartolucci, A.A., and Cooper, M.D. Monoclonal antibody characterization of surface antigens in childhood T-cell lymphoid malignancies. *Blood.* 61.

830-837. 1983.

65. Benard, A., Boumsell, L., Reinherz, E. L., Nadler, L. M., Ritz, J., Coppin, H., Richard, I., Valensi, F., Dausset, J., Flandrin, G., Lemerle, J., Schlossman, S. F. Cell surface characterization of malignant T-cells from lymphoblastic lymphoma using monoclonal antibodies: evidence for phenotyping differences between malignant T-cells from patients with ALL and lymphoblastic lymphoma. *Blood*. 57. 1105.-1110. 1981.
66. Hoffmann-Fezer, G., Knapp, W., Thierfelder, S., Anatomical distribution of CALL antigen expressing cells in normal tissue and in lymphomas. *Leuk. Res.* 6. 761-767. 1983.
67. Pesando, J. M., Ritz, J., Levine, H., Terhorst, C., Lazarus, H., Schlossman, S. F. Human leukemia associated antigen: relation to a family of surface glycoproteins. *J. Immunol.* 124. 2794 - 2799. 1980.
68. Hoffbrand, A. V., Ganeshaguru, K., Janossy, G., Greaves, M. F., Catovsky, D., Woodruff, R. K. Terminal deoxynucleotidyl transferase levels and membrane phenotypes in diagnosis of acute leukaemia. *Lancet*. II. 520-523. 1977.
69. Hoelzer, D., Thiel, E., Löffler, H., Bodenstein, H., Plaumann, L., Büchner, Th., Urbanitz, D., Koch, P., Heimpel, H., Engelhardt, R., Müller, U., Wendt, F. C., Sodomann, H., Rühl, H., Herrmann, F., Kaboth, W., Dietzelbinger, H., Pralle, H., Lunschken, Ch., Hellriegel, K. P., Spors, S., Noworussian, M., Fisscher, J., Fülle, H. H., Mitron, P., Pfreundschuch, M., Görg, Ch., Emmerich, B., Queisser, W., Meyer, P., Labedzki, L., Essers, U., König, H., Mainzer, K., Fritze, D., Messerer, D. and Zwingers, Th. Intensified therapy in acute lymphatic and undifferentiated leukaemia in adults - definition of risk groups. *Blood*. Im Druck.

70. Belpomme, D., Mathé, G. Clinical significance and prognostic value of the T - B immunological classification of human primary acute lymphoblastic leukaemias. *Lancet*. I. 555-558. 1977.
71. Thiel, E., Rodt, H., Huhn, D., Netzel, B., Grosse-Wilde, H., Ganeshaguru, K., and Thierfelder, S. Multimarker classification of acute lymphoblastic leukemia. Evidence for further T subgroups and evaluation of their clinical significance. *Blood*. 56. 759 - 772. 1980.
72. Kersey, J., Goldmann, A., Abramson, C., Nesbit, M., Perry, G., Gajl-Peczalska, K., LeBien, T. Clinical usefulness of monoclonal antibody phenotyping in childhood ALL. *Lancet*. II. 1419-1423. 1982.
73. Catovsky, D., Pittman, S., O'Brien, M., Cherchi, M., Costello, C., Foa, R., Pearce, E., Hoffbrand, A.V., Janossy, G., Ganeshaguru, H., and Greaves, M.F., Multiparameter studies of lymphoid leukemias. *Am. J. Clin. Pathol.* 72. 736-745, suppl. 1979.
74. Thöne, I., Kabisch, H., Müller, J., Winkler, K., und Landbeck, G. Immunologische Klassifizierung der akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) des Kindesalters. Ursprung und klinische Bedeutung der phänotypischen Variabilität. *Monatschr. Kinderheilkd.* 131. 883-890. 1982.
75. Tsubota, T., Minowada, J., Nakazawa, S., Sinks, L.F., Han, T., Higby, R.J., and Pressman, D. Correlation of surface markers of cells of human lymphatic leukemias with disease type. *J. Nat. Cancer Inst.* 59. 845-850. 1977.
76. Greaves, M.F. Analysis of the clinical and biological significance of lymphoid phenotypes in acute leukemia. *Cancer Res.* 41. 4752-4766. 1981.
77. Simone, J.V., Verzosa, M.S., Rudy, J.A. Initial features and

- prognosis in 363 children with ALL. *Cancer*. 36, 2099-2108. 1975.
78. Chessells, J. M., Hardisty, R. M., Rapson, N. T., Greaves, M. F. Acute lymphoblastic leukaemia in children: classification and prognosis. *Lancet*. II. 1307-1309. 1977.
79. Henze, G., Langermann, H. -J., Müller, St., Odenwald, E., Riehm, H. The probability of childhood T - ALL based on clinical parameters: Influence of therapy on prognosis. *Eur. J. Pediatr*. 130. 209 (Abstr.). 1979.
80. Imbach, P., Hirt, A., Küchler, H., Morell, A., Tönz, O., Wagner, H. P., Relevancy of prognostic factors in childhood acute lymphoid leukemia (ALL): Experiences with 40 patients. *Eur. J. Pediatr*. 130. 209 (Abstr.). 1979.
81. Baumer, J. H., Mott, M. G. Sex and prognosis in childhood ALL. *Lancet*. II. 128-129. 1978.
82. Thompson, J., Burns, P. C., Wiltse, C. G., Armitage, J. O. and Clarke, W. R. Prognostic influence of pretreatment characteristics in adult ALL. *Blood*. 56. 510-515. 1980.
83. Gee, T. S., Hagbin, M., Dowling, M. D., Cunningham, I., Middleman, M. P., and Clarkson, B. D. ALL in adults and children. *Cancer*. 42. 817-827. 1978.
84. Greaves, M. F., Lister, T. A. Prognostic importance of immunologic markers in adult ALL. *N. Engl. J. Med*. 304. 119-120. 1981.
85. Lister, T. A., Roberts, M. M., Brearley, R. L., Woodruff, R. K., and Greaves, M. F. Prognostic significance of cell surface phenotype in adult ALL. *Cancer Immunol. Immunother*. 6. 227.230. 1979.
86. Stryckmans, P., Suciu, P., Otten, J., Delbeke, M. J., Solbu, G., Maurers, R., Benoit, Y., Reginster, M., Prognostic value of the hematological blood status at diagnosis in ALL. *Proc. of the 7th Meeting of ISH, European & African Division, Barcelona, 1983.*

87. Dow, L.W., Borella, L., Sen, L., Aur, R.J.A., George, S.L., Mauer, A.M., Simone, J.V. Initial prognostic factors and lymphoblast - erythrocyte rosette formation in 109 children with ALL. *Blood*. 50. 671-682. 1977.
88. Sen, L., and Borella, L. Clinical importance of lymphoblasts with T markers in childhood acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 292. 828-832. 1975.
89. Hann, H.-W.L., Lustbader, E.D., Evans, A.E., Toledano, S.R., Lille, P.D., and Jasko, L.B. Lack of influence of T-cell marker and importance of mediastinal mass on the prognosis of ALLs in childhood. *J. Natl. Cancer Inst.* 66.285-290. 1981.
90. Henze, G. Habilitationsschrift.
91. Feldges, A.J., Aur, R.J.A., Verzosa, M.S. and Daniels, S. Periodic acid - schiff reaction, a useful index of duration of complete remission in acute childhood lymphocytic leukemia. *Acta Haemat.* 52. 8-13. 1974.
92. Vowels, M.R., and Willoughby, M.L.N. Cyclic chemotherapy in ALL of childhood. 5 year survivals. *Arch. Dis. Childh.* 48. 436-440. 1973.
93. Miller, D.R., Leikin, S., Albo, V., Vitale, L., Sather, H., Coccia, P., Nesbit, M., Karon, M., and Hammond, D., Use of prognostic factors in improving the design and efficiency of clinical trials in childhood leukemia. *Children's Cancer Study Group Report. Cancer Treat. Rep.* 64. 382-391. 1980.
94. Viana, M.B., Maurer, H.S., Ferenc, C. Subclassification of ALL in children: analysis of the reproducibility of morphological criteria and prognostic implications. *Br. J. Haematol.* 44. 383-388. 1980.
95. Vecchi, V., Rosito, P., Vivarelli, F., Mancini, A.F., Pession, A., Paolucci, G., Prognostic significance of lymphoblast morphology in ALL in childhood. *Br. J. Haematol.* 45. 178-181. 1980.

96. Wolff, L.J., Richardson, S.T., Neiburger, J.B., Neiburger, R.G., Irwin, D.S., and Bachner, R.L. Poor prognosis of children with ALL and increased B-cell markers. *J. Pediatr.* 89. 956-958. 1976.
97. Seligmann, M., Vogler, L.B., Preud'homme, J.L., Guglielmi, P., and Brouet J.C. Immunological phenotypes of human leukemias of the B-cell lineage. *Blood cells*. 7. 237-246. 1981.
98. Brouet, J.C., Seligmann, M. The immunological classification of ALLs. *Cancer*, 36. 2099-2108. 1975.
99. Sallan, S.E., Ritz, J., Pesando, J., Gelber, R., O'Brien, C., Hitchcock, S., Coral, F., and Schlossman, S.F. Cell surface antigens: prognostic implications in childhood ALL. *Blood*, 55. 395-402. 1980.
100. Tsukimoto, I., Wong, K.Y., and Lampkin, B.C. Surface markers and prognostic factors in ALL. *N. Engl. J. Med.* 294. 245-248. 1976.
101. Thiel, E., Hoelzer, D., Schwarzkopf, G., Rodt, H., Schubel, H., Thierfelder, S., The rank order of prognosis for various ALL phenotypes is different in children and adults treated by intensive protocols. *Proc. of the 7th Meeting of ISH, European & African Division, Barcelona, 1983.*
102. van der Reijden, H.J., van Wering, E.R., van de Rijn, J.M., Melief, C.J.M., van't Veer, M.B., Behrendt, H., von dem Borne, A.E.G. Immunological typing of acute lymphoblastic leukaemia. *Scand. J. Haematol.* 30. 356-366. 1983.
103. Bernard, A., Raynal, B., Lemerle, J., Boumsell, L. Changes in surface antigens on malignant T-cells from lymphoblastic lymphomas at relapse. An appraisal with monoclonal antibodies and microfluorometry. *Blood*, 59. 809-812. 1982.
104. Thiel, E., Rodt, H. and Thierfelder, S. Leukemic cell phenoty-

- pes and the lymphoid differentiation pathway. *Haematologica*, 66. 389-408. 1981.
105. Cossman, J., Neckers, L. M., Arnold, A., and Korsmeyer, S. J., Induction of differentiation in a case of common ALL. *N. Engl. J. Med.* 307. 1251-1254. 1982.
106. Wisch, J. S., Griffin, D. J., and Kufe, D. W. Response of preleukemic syndromes to continuous infusion of low-dose cytarabine. *N. Engl. J. Med.* 309. 1599-1602. 1983.
107. Vitetta, E. S., Krolick, K. A., and Uhr, J. W. Selective killing of neoplastic B lymphocytes with antibody-ricin A chain conjugates. in W. Knapp, ed. *Leukemia Markers*, London, Academic Press 1981.
108. Seon, B. K. Specific killing of human T-leukemia cells by immunotoxins prepared with ricin A chain and monoclonal anti-human T-cell leukemia. *Cancer Res.* 44. 259-264. 1984.
109. Netzel, B., Rodt, H., Haas, R. J., Kolb, H. J., Thierfelder, S. Immunological conditioning of bone marrow for autotransplantation in childhood ALL. *Lancet*, I. 1330-1332. 1980.
110. Ritz, J., Sallan, E., Bast, R. C., Lipton, J. M., Nathan, D. G., Schlossman, S. F. Autologous bone marrow transplantation in cALLA positive ALL following in vitro treatment with J5 monoclonal antibody and complement. *Blood*, 58 (Suppl. 1) 175a. 1981.
111. Hirt, A., Baumgartner, C., Forster, H. K., Imbach, P., and Wagner, H. P. Reactivity of the ALL and normal bone marrow cells with the monoclonal anti B lymphocyte antibody, anti Y 29/55. *Cancer Res.* 43. 4483-4485. 1983.
112. Miller, R. A., Maloney, D. G., Warnke, R., Levy, R., Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N. Engl. J. Med.* 306. 517-522. 1982.

113. van der Reijden, H.J., van Rhenen, D.J., Langsdsdorp, P.M., van't Veer M.B., Langenhuijsen M.M.A.C., Engelfriet, C.P., and von dem Borne A.E.G. A comparison of surface markers analysis and FAB classification in acute myeloid leukemia. Blood, 61. 443-448. 1983.
114. Griffin, J.D., Mayer, R.J., Weinstein, H.J., Rosenthal, D.S., Coral, F.S., Beveridge, R.P., and Schlossman, S.F. Surface marker analysis of a myeloblastic leukemia: identification of differentiation associated phenotypes. Blood 63. 557-563. 1983.
115. Herrmann, F., Komischke, B., Odenwald, E., and Ludwig, W-D. Use of monoclonal antibodies as a diagnostic tool in human leukemia. I. Acute myeloid leukemia and acute phase of chronic myeloid leukemia. Blut. 47. 157-163. 1983.
116. McCulloch, E.A. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis. (Henry Stratton Lecture, 1982). Blood. 62. 1-13. 1983.

Danksagung

Der Autor dankt:

Herrn Prof. Dr. H. Brücher für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. H. Riehm für die Überlassung des Patientenmaterials der BFM Studie 81/83.

Herrn H. -J. Langermann für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Frau B. Komischke und Frau E. Odenwald für technische Assistenz.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. F. Herrmann für die Überlassung der Methodik und die wissenschaftliche Anleitung in jeder Phase der Arbeit sowie die Bereitstellung der Laboreinrichtungen und Antikörper.

Lebenslauf

Am 3. März 1955 wurde ich als Sohn des Rechtsanwaltes Edmund Kołdecki und seiner Ehefrau Zofia, geb. Szuda, in Poznań/Polen geboren. Die Volksschule und das Gymnasium besuchte ich ebenfalls in Poznań, wo ich auch im Mai 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Im Oktober 1974 begann ich das Studium der Medizin an der Medizinischen Akademie zu Poznań. Am 19 Juni 1980 schloß ich mein Studium mit der ärztlichen Prüfung ab.

Nach meiner Medizinalassistentenzeit, die ich an den Kliniken der Medizinischen Akademie Poznań absolvierte, begann ich im November 1981 meine Ausbildung zum Facharzt für Pädiatrie an der I. Kinderklinik des Instituts für Pädiatrie der Medizinischen Akademie Poznań, wo ich überwiegend im hämatologischen Bereich eingesetzt worden bin.

Vom 1. Oktober 1982 bis dato bin ich als Stipendiat im Rahmen des Fortbildungsprogramms des Berliner Senators für Gesundheit, Soziales und Familie in Berlin tätig. Ich habe hier eine klinisch-pädiatrisch-onkologische Ausbildung in der Abteilung für Pädiatrie II mit Schwerpunkt Hämatologie der Kinderklinik der FUB (Prof. Riehm), sowie eine immunologische Ausbildung unter der Leitung von Dr. Herrmann im Hämatologischen Zentrallabor der Abteilung für Hämatologie/Onkologie, Klinikum Steglitz der FUB (Prof. Brücher) erfahren.



— D. Hansen & K. Höpfner GbR —

DISSERTATIONSDRUCK

Pestalozzistraße 106 (Ecke Bleibtreustraße)
Telefon 312 50 93 und 312 50 94
